

**Zur Primärstruktur der
Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
aus Kaninchenmuskel:
Isolierung eines methioninhaltigen Überlappungspeptides
und des C-terminalen tryptischen Peptides**

Wolfgang Homma

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0087

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Physikalische
Biochemie und Zellbiologie der Universität München

Vorstände:

Prof. Dr. Dr.h.c. Th. Bücher, Prof. Dr. E.M. Klingenberg,
Prof. Dr. F. Miller, Prof. Dr. H.G. Zachau

Zur Primärstruktur der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
aus Kaninchenmuskel:

Isolierung eines methioninhaltigen Überlappungspeptides
und des C-terminalen tryptischen Peptides



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Homma
aus Wasserburg/Inn

1976

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.- Doz. Dr. W. Machleidt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr.h.c. Th. Bücher
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.76



Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher danke ich
vielmals für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und
für die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Joachim Otto, der
mich gründlich in das Arbeitsgebiet einführte und mir
durch ständige Ermutigungen weiterhalf.

Herrn Priv.- Doz. Dr. Werner Machleidt danke ich
herzlichst für die intensive Betreuung und seinen
persönlichen Einsatz bei der Fertigstellung der Arbeit.
Herrn Dr. Elmar Wachter danke ich für seine experi-
mentelle Hilfe bei der automatischen Sequenzierung der
Peptide.

Für die geschickte und sehr zuverlässige technische
Assistenz bedanke ich mich bei Fräulein Hanna Kummer
und Herrn Josef Zach, sowie bei Frau Gerda Behrens
und Fräulein Gabi Schneider.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
B. Ergebnisse	5
1. Citraconylierung des Enzymproteins	5
2. Tryptische Peptide nach Citraconylierung der Lysinreste	8
2.1. Fraktion E	10
2.2. Fraktion F	14
2.3. Fraktion C + D	24
2.3.1. Peptid C IV	27
2.3.2. Peptid C V	39
C. Diskussion	41
D. Experimenteller Teil	49
1. Material	49
1.1. Reagenzien und Lösungsmittel	49
1.2. Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase	49
2. Modifizierungsreaktionen	49
2.1. ^{14}C -Carboxymethylierung	49
2.2. Citraconylierung	50
2.3. Deblockierung der citraconylierten Peptide	51
3. Spaltungen	51
3.1. Tryptische Spaltung	51
3.2. Bromcyanspaltung	51
4. Isolierung der Peptide	52
4.1. Säulenchromatographie	52
4.2. Dünnschicht-Chromatographie	54

5. Analytische Methoden	54
5.1. Mengenbestimmungen von Protein und Peptiden durch UV-Spektrophotometrie	54
5.2. Radioaktivitätsmessungen	55
5.3. Aminosäureanalyse	55
5.4. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren von Peptiden mit der Dansyl-Technik	55
6. Sequenzierung der Peptide	56
6.1. Automatische Sequenzierung am Festkörper	56
6.2. Sequenzierung mit der Dansyl-Edman-Technik	59
E. Zusammenfassung	60
F. Literaturverzeichnis	61
G. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	64
1. Aminosäuren	64
2. Andere Abkürzungen	64

A. Einleitung

Die NAD-abhängigen Dehydrogenasen benutzen zwar das gleiche Coenzym, katalysieren aber die Übertragung des Wasserstoffs von sehr verschiedenen Substraten. Dennoch mehren sich die Hinweise dafür, daß diese phylogenetisch sehr alten Enzyme aus einer gemeinsamen Vorstufe entstanden sind, aus einem NAD-bindenden Protein (1).

Diese Hypothese stützt sich auf die bekannten Strukturen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Sequenz, 2, und Röntgenstrukturanalyse, 3), der Alkohol-Dehydrogenase (Sequenz und Röntgenstrukturanalyse, 4), der Glutamat-Dehydrogenase (Sequenz und Röntgenstrukturanalyse, 5), der Lactat-Dehydrogenase (fast vollständige Sequenz und Röntgenstrukturanalyse, 6) sowie der Malat-Dehydrogenase (Teilsequenzen und Röntgenstrukturanalyse, 7).

Ein Beitrag zur Bestätigung und Erweiterung dieser Vorstellungen ist von der Primärstruktur der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH, EC. 1.1.1.8) aus Kaninchenmuskeln zu erwarten, die in diesem Institut bearbeitet wird.

Die bekannten Aminosäuresequenzen von NAD-abhängigen Dehydrogenasen wurden fast ausschließlich mit manuellen Methoden bestimmt. Diese in der Regel langwierige Prozedur kann durch Verwendung automatischer Sequenzierungsmethoden abgekürzt werden.

Eine neue Variante der automatischen Sequenzierung ist die Solid-Phase-Methode (8,9). Bei dieser Methode wird das Peptid oder Protein nach kovalenter Bindung an einen Träger an der festen Phase automatisch sequenziert (Abb. 1). Die Festphasen-Methode ist technisch einfach und weniger kostspielig als der Flüssigphasen-Sequenator nach Edman und Begg (10). Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Solid-Phase-Methode ist allerdings, daß die Ankopplung der zu sequenzierenden Peptide bzw. Proteine an den Träger gelingt.

Die automatische Sequenzierung mit der Solid-Phase-Methode hat rasch Verbreitung gefunden. Sie wurde bisher fast ausschließlich als Ergänzung der manuellen Methoden oder des Edman-Begg-Sequenators eingesetzt (z.B. 11,12). Bei konsequenter Anwendung sollte es jedoch möglich sein, allein mit Hilfe der Solid-Phase-Methode ein größeres Protein automatisch zu sequenzieren. Dieses Ziel wird bei der Sequenzanalyse der GDH verfolgt.

Die GDH aus Kaninchenmuskel besteht aus zwei identischen Untereinheiten von je 350 Aminosäuren (13,14). Um die Möglichkeiten der automatischen Sequenzierung langer Abschnitte voll auszuschöpfen, wurde versucht, durch selektive Spaltungen die Untereinheit in wenige große Fragmente zu zerlegen. Dazu hat sich die Bromcyanspaltung (15) bewährt, weil diese chemische Spaltung spezifisch ist, und die entstehenden Fragmente zur Sequenzierung am festen Träger besonders geeignet sind (16,17). Die GDH-Untereinheit enthält 9 Methionine, von denen eines C-terminal steht (13). Durch Sequenzierung von Bromcyanpeptiden sind inzwischen rund $3/4$ der Primärstruktur der GDH ermittelt worden (18; G. Rückl, Dissertation, in Vorbereitung; J. Otto, E. Wachter, W. Machleidt, unveröffentlichte Ergebnisse).

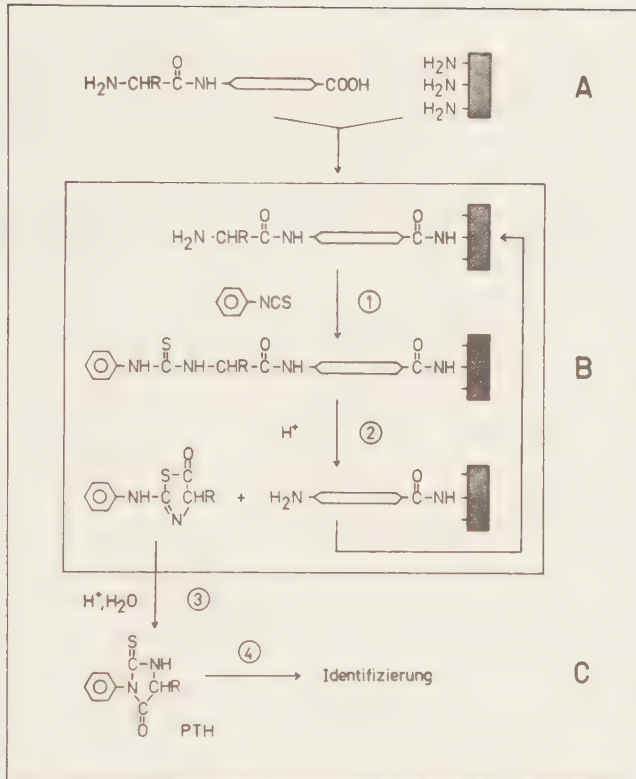


Abb. 1: Prinzip der Solid-Phase-Methode zur automatischen Sequenzierung von Peptiden und Proteinen

Das Peptid bzw. Protein wird durch eine chemische Reaktion kovalent an einen unlöslichen Träger (Polystyrol, poröses Glas) gebunden (A). In einer automatischen Apparatur ("Solid-Phase-Sequencer") wird das trägergebundene Peptid mit Hilfe der Edman-Reaktionen (20) schrittweise vom Aminoende her abgebaut (B):

- (1) Kopplung der terminalen Aminogruppe des Peptids mit Phenylisothiocyanat zum Phenylthiocarbamyl-Peptid,
- (2) Abspaltung der N-terminalen Aminosäure als Anilino-Thiazolinon (mit wasserfreier Trifluoressigsäure).

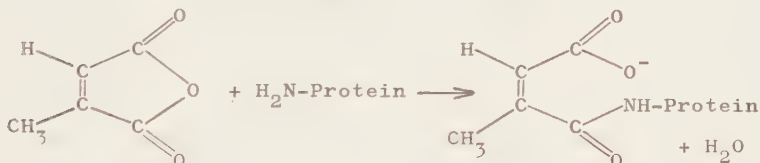
Außerhalb des Sequencers (C) wird das Thiazolinon in das stabilere Phenylthiohydantoin (PTH) umgewandelt (3) und von störenden Nebenprodukten gereinigt (4). Durch die Identifizierung der nacheinander abgespaltenen Aminosäure-PTHs wird die Sequenz des Peptids bestimmt.

Die Aneinanderreihung der Bromcyanfragmente gelang in einigen Fällen mit Hilfe früher isolierter methioninhaltiger tryptischer Peptide (13,19). Andere Bromcyanpeptide konnten jedoch bis jetzt noch nicht überlappt werden. Versuche zur Isolierung der fehlenden Überlappungspeptide werden in der vorliegenden Arbeit beschrieben.

B. E r g e b n i s s e

1. Citraconylierung des Enzymproteins

Zur Beschränkung der Trypsin-Spaltung auf die Arginylnbindungen wurden die Seitenketten der Lysinreste acyliert:



Die durch Umsetzung des Proteins mit Citraconsäureanhydrid gebildeten Citraconylderivate sind bei alkalischem pH stabil. Bei saurem pH können die Acylreste abgespalten und die ϵ -Aminogruppen der Lysinreste regeneriert werden (21,22). Die Halbwertszeit von ϵ -N-Citraconyl-Lysin bei pH 3,5 beträgt 2 h (20 °C).

Da Citraconsäureanhydrid auch mit freien Cysteinresten reagiert, wurde die GDH zunächst mit ^{14}C -Jodessigsäure carboxymethyliert (23). Die radioaktive Markierung der 10 Cysteinreste pro GDH-Untereinheit erleichtert die Detektion und quantitative Bestimmung der Peptide bei den Trennungen und die Quantifizierung der Ankopplungsreaktionen für die Festphasen-Sequenzierung.

Unter den hier gewählten Bedingungen wurden 9,7 Mol Jodessigsäure pro Mol GDH-Untereinheit eingebaut. In der Aminosäureanalyse wurden neben Carboxymethylcystein keine Carboxymethyl-Derivate anderer Aminosäuren gefunden, so daß die Carboxymethylierung der GDH als weitgehend spezi-

fisch anzusehen ist. Dafür spricht auch die gute Übereinstimmung der spezifischen Radioaktivität der Cysteinreste in der ^{14}C -carboxymethylierten GDH-Untereinheit mit der in verschiedenen isolierten Peptiden gefundenen (vgl. B.2.):

	^{14}C -CM-GDH Untereinheit	Peptid E I	Peptid FaBrCN	Peptid C V
Spez. Rad. nCi/nMol Cys	0,345	0,349	0,357	0,300

Zur eindeutigen Beschränkung der Trypsin-Spaltung auf die Argininreste müssen alle Lysinreste vollständig blockiert sein. Eine quantitative Kontrolle der Lysin-Modifizierung ermöglicht das UV-Spektrum des modifizierten Proteins (Abb. 2).

Für die ^{14}C -carboxymethylierte GDH-Untereinheit in 6 M Guanidiniumchlorid pH 8,5 wurde daraus bei 250 nm ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{250} = 10,42 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt, für die citraconylierte ^{14}C -CM-GDH-Untereinheit ein $\epsilon_{250} = 70,12 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Vergleich der für die Spektren eingesetzten Mengen über die Radioaktivität). Unter Annahme eines $\epsilon_{250} = 2,18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für ϵ -N-Citraconyl-Lys (22) sind somit pro GDH-Untereinheit $(70,12 \times 10^3 - 10,42 \times 10^3) : (2,18 \times 10^3) = 27,39$ Citraconylreste gebunden. Dieser Wert liegt sehr nahe bei dem theoretisch zu erwartenden Wert von 28 (28 Lysinreste, N-Terminus acetyliert).

In einem weiteren Versuch wurden die freien ϵ -Aminogruppen der Lysinreste mit Dinitrobenzoesulfonsäure umgesetzt (24). Dabei entstehen hydrolysestabile Dinitrophenylderivate, die in der Aminosäureanalyse nicht nachweisbar sind.

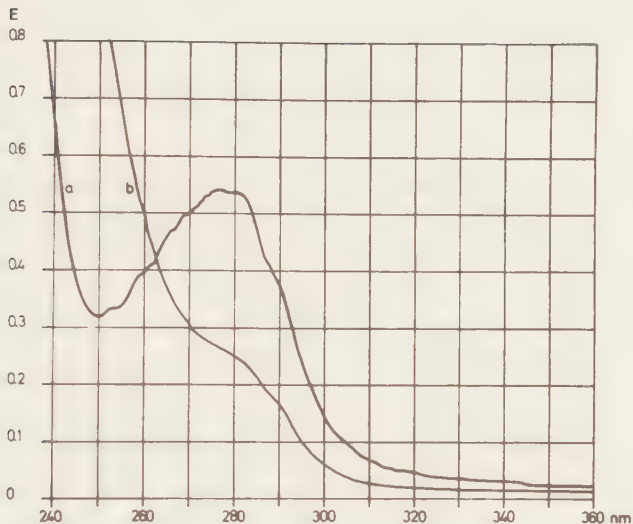


Abb. 2:
UV-Absorptionsspektren der ^{14}C -carboxymethylierten GDH
(a; 1,06 mg/ml)
und der citraconylierten ^{14}C -carboxymethylierten GDH
(b; 0,50 mg/ml)
in 0,1 M Natriumpyrophosphatpuffer pH 8,5 6 M Guanidini-
umchlorid.

In der Aminosäureanalyse des citraconylierten Proteins wurden praktisch alle Lysinreste wiedergefunden. Das Hydrolysat der nicht citraconylierten Kontrolle enthielt dagegen weniger als 2 % der zu erwartenden Lysine.

Wegen der Säurelabilität der Citraconyllderivate wurden alle Prozeduren am modifizierten Protein bzw. an den modifizierten Peptiden (bis zur evtl. Deblockierung) bei pH-Werten über 8 durchgeführt.

2. Tryptische Peptide nach Citraconylierung der Lysinreste

Die citraconylierte ^{14}C -carboxymethylierte GDH wurde in Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6 4 h lang bei 37 °C mit TPCK-Trypsin gespalten und anschließend sofort lyophilisiert. Bis zur Abtrennung evtl. noch aktiven Trypsins durch die primäre Gelchromatographie (s.u.) wurde das Lyophilisat bei -25 °C aufbewahrt.

Die Trennung der tryptischen Peptide der citraconylierten GDH durch Gelchromatographie an Bio-Gel P-30 wurde zunächst an 50 nMol analytisch erprobt und anschließend mit 1 μMol im präparativem Maßstab reproduziert (Abb. 3). Aus der präparativen Chromatographie wurden 7 Fraktionen geschnitten.

Die Fraktionen A-F wurden auf Bio-Gel P-30 rechromatographiert. Zur Charakterisierung und Reinheitskontrolle der rechromatographierten Peptidfraktionen diente die eindimensionale Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel. Dabei zeigte sich, daß nur die Fraktion E überwiegend aus einem reinen Peptid bestand. Alle übrigen Peptide waren Gemische mehrerer Peptide.

Die weitere Auftrennung der Gelfraktionen A und B (Abb. 3) auf dem Anionenaustauscher QAE-Sephadex zeigt Abb. 4. Wegen ihrer komplexen Zusammensetzung wurden diese Fraktionen mit großen Peptiden hier nicht weiter bearbeitet (vgl. Diskussion). Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Isolierung von Peptiden beschränkt sich auf die Gelfraktionen C, D, E und F.

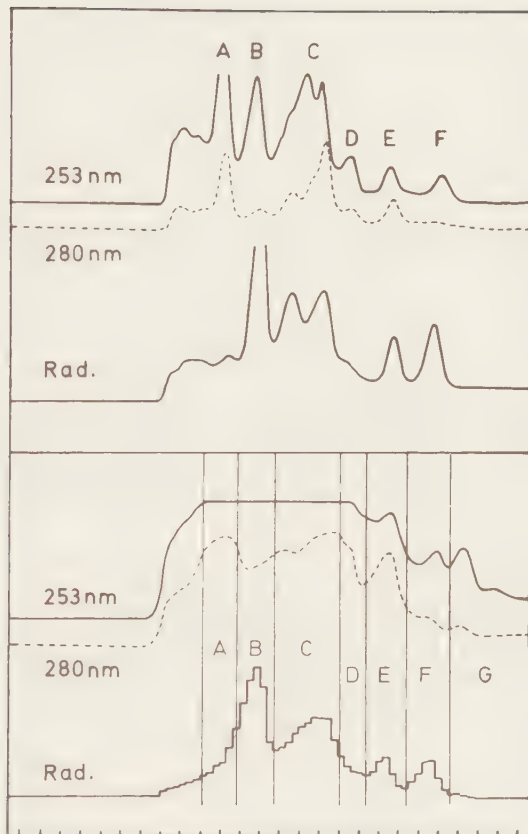


Abb. 3:

Gelchromatographie der tryptischen Peptide der citraconylierten ^{14}C -CM-GDH auf Bio-Gel P-30 in 0,1 M Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6.

Obere Hälfte: Analytisches Chromatogramm von 50 nMol auf einer 0,4 x 150 cm - Säule (0,45 ml/h). Elutionsprofile (von oben nach unten): Extinktion bei 253 nm, 280 nm (gestrichelt) und Radioaktivität im Durchfluß-Szintillationszähler (Vollausschlag 5×10^5 Impulse/min).

Untere Hälfte: Präparatives Chromatogramm von 1 μMol auf einer 0,8 x 150 cm - Säule (1,8 ml/h). Elutionsprofile (von oben nach unten): Transmission bei 253 nm, 280 nm (gestrichelt) und Radioaktivität der Fraktionen. Durch die Überladung der UV-Detektoren wird eine schlechtere Trennung vorgetäuscht.

Zur Rechromatographie wurden die Fraktionen A-G geschnitten.

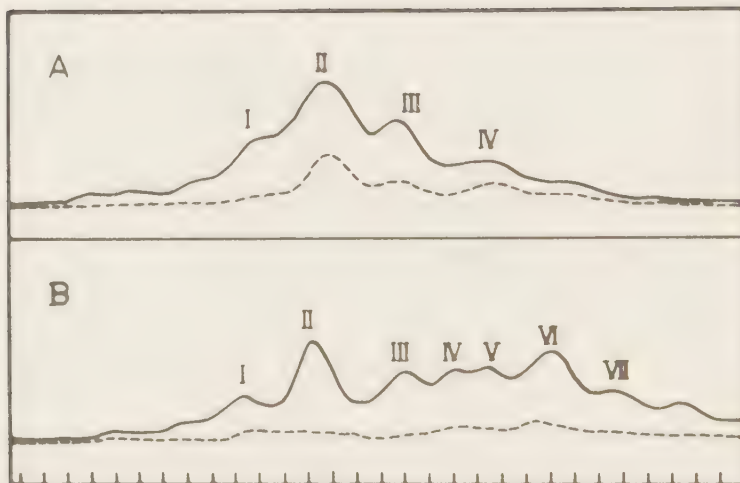


Abb. 4:

Anionenaustausch-Chromatographie der Gelfractionen A und B (Abb. 3) auf QAE-Sephadex A-25. Analytische Chromatographie von je 50 nMol auf einer 0,1 x 100 cm - Säule, äquilibriert mit 25 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6. Elution mit einem Konzentrationsgradienten dieses Puffers ($c_0 = 1$ M; $v_0 = 12,5$ ml; $R_1 = R_2 = 0,18$ ml/h entsprechend Abb. 33). Elutionsprofile: Transmission bei 253 nm und 280 nm (gestrichelt). Zeitmarken auf der Abszisse im Abstand von 1 h.

2.1. Fraktion E

Abb. 5 zeigt die Rechromatographie der Fraktion E auf Bio-Gel P-30. Wie aus der Dünnschicht-Chromatographie hervorgeht (Abb. 6), besteht diese Fraktion vorwiegend aus einem reinen Peptid, das radioaktiv markiertes CM-Cys enthält. Nach der Dünnschichtplatte ist jedoch zu erwarten, daß die Hauptkomponente noch beträchtlich verunreinigt ist. Das zeigt sich auch in der Aminosäureanalyse (Tab. 1).

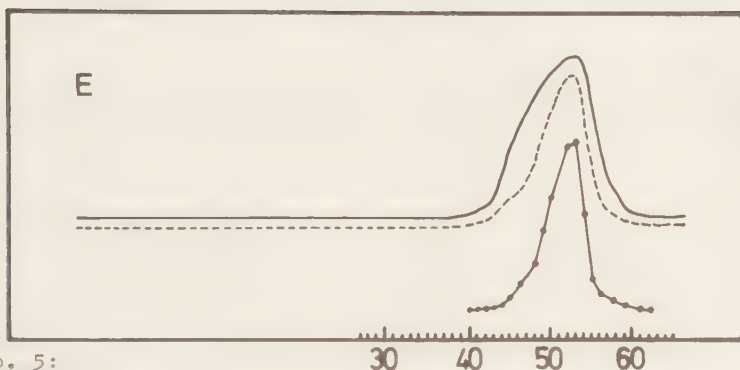


Abb. 5:

Rechromatographie der Gelfraktion E (Abb. 3) auf 0,6 x 150 cm Bio-Gel P 30 (1,2 ml/h). Elutionsprofile (von oben nach unten): Transmission bei 253 nm, 280 nm (gestrichelt) und Radioaktivität der Fraktionen. Dünnschicht-Chromatographie der 20-min-Fractionen siehe Abb. 6.

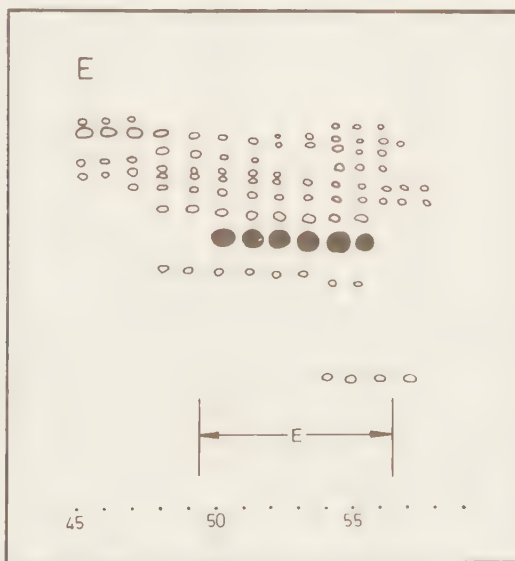


Abb. 6:

Dünnschicht-Chromatographie der Fraktionen 45-57 aus der Rechromatographie von E (Abb. 5). Zur weiteren Auftrennung wurden die Fraktionen 50-56 geschnitten.

Tab. 1:

Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen E (Abb. 6) und E I (Abb. 7)

	E	E I	
CM-Cys	0,61	0,86	1
Asx	0,40	+	
Thr	+	+	
Ser	0,56	+	
Glx	3,07	2,94	3
Pro	1,35	1,01	1
Gly	2,55	2,05	2
Ala	0,65	0,10	
Val	2,29	1,94	2
Ile	1,01	0,89	1
Leu	0,44	0,08	
Tyr	0,90	0,95	1
Phe	0,92	0,95	1
Lys	1,46	1,06	1
Arg	1,00	0,98	1

Zur weiteren Reinigung wurden die Fraktionen 50-56 auf dem Anionenaustauscher QAE-Sephadex rechromatographiert (Abb. 7). Die Hauptkomponente E I ist nach der Aminosäureanalyse (Tab. 1) ein reines Peptid, das ein (citronyliertes) Lys und ein Arg enthält, sowie ein CM-Cys, ein Tyr und ein Phe.

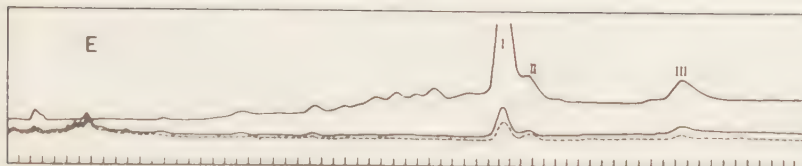


Abb. 7:

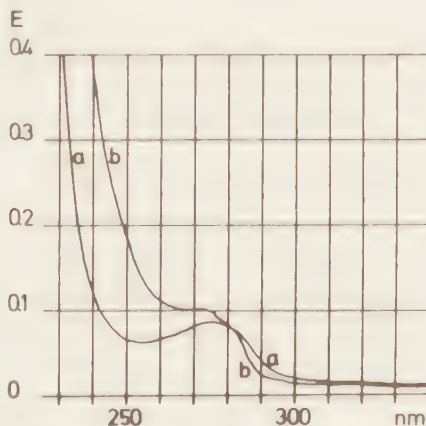
Anionenaustausch-Chromatographie der Fraktionen E 50-56 (Abb. 6) auf $0,3 \times 100$ cm QAE-Sephadex A-25, äquilibriert mit 25 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6. Elution mit einem Konzentrationsgradienten dieses Puffers ($c_0 = 1$ M; $v_0 = 56,0$ ml; $R_1 = R_2 = 0,75$ ml/h entsprechend Abb. 33). Elutionsprofile (von oben nach unten): Transmission bei 225 nm, 253 nm und 280 nm (gestrichelt). Zeitmarken auf der Abszisse im Abstand von 1 h.

Abb. 8 zeigt das UV-Absorptionsspektrum des Peptids E I. Wegen der Absorption des Citraconylrests am Lysin ($\epsilon_{250} = 2,18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ist die Extinktion des Peptids bei 250 nm höher als bei 280 nm. Aufgrund dieser Relation sind citraconylierte Peptide in den säulenchromatographischen Elutionsprofilen leicht zu erkennen (vgl. Abb. 7). Die Absorption von Phe bei 250 nm ($\epsilon_{250} = 1,50 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Abb. 8:

UV-Absorptionsspektrum des Peptids E I in Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6

- a: deblockiertes Peptid (60 μM)
- b: citraconyliertes Peptid (70 μM)



ist vergleichsweise gering und kann in den meisten Fällen vernachlässigt werden. Im Spektrum des Peptids E I nach Abspaltung des Citraconylrests (Deblockierung) überwiegt die Absorption des Tyrosinrests bei 280 nm, so daß $E_{250} < E_{280}$ wird. Anhand solcher Veränderungen kann man generell die Deblockierung citraconylierter Peptide an den Elutionsprofilen bzw. an den UV-Spektren verfolgen.

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure des Peptids mit der Dansyl-Technik ergab α -Dansyl-Lys, nach Deblockierung bis β -Dansyl-Lys. Mit der Dansyl-Edman-Methode wurde die N-terminale Teilsequenz

Lys - Val - Cys - Tyr - ...

bestimmt. Aufgrund dieser Partialsequenz und der Aminosäurezusammensetzung konnte E I als Teilstück eines bereits sequenzierten Bromcyanpeptids identifiziert werden (s. Diskussion).

2.2. Fraktion F

Die Fraktion F ergibt bei der Rechromatographie auf Bio-Gel P-30 (Abb. 9) zwei Fraktionen (Fa und Fb), von denen eine (Fa) Radioaktivität enthält. Nach der Dünnschicht-Chromatographie (Abb. 10) besteht die radioaktive Fraktion Fa aus zwei Hauptkomponenten, die sich gelchromatographisch nicht trennen. Eine teilweise Trennung dieser Komponenten (Fa I und Fa II) gelingt erst durch Anionenaustausch-Chromatographie auf QAE-Sephadex (Abb. 11). Dabei

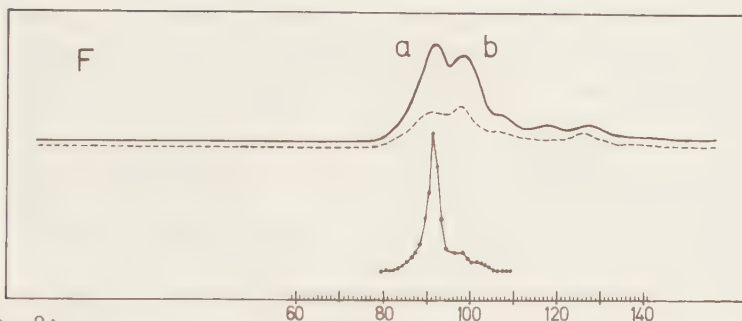
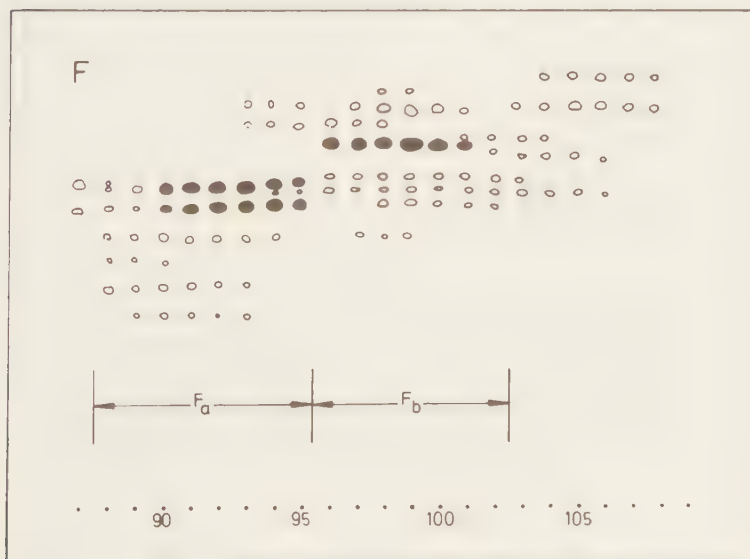


Abb. 9:

Rechromatographie der Gelfraktion F (Abb. 3) auf 0,6 x 150 cm Bio-Gel P-30 in 0,1 M Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6 (1,2 ml/h). Elutionsprofile (von oben nach unten): Transmission bei 253 nm, 280 nm (gestrichelt), Radioaktivität der 20-min-Fractionen.

Abb. 10:

Analytische Dünnschicht-Chromatographie der Fraktionen 87-109 aus Abb. 9. Anfärbung mit Fluorescamin.



zeigt sich, daß nur die Komponente Fa I radioaktiv ist, und daß diese Komponente keinen Citraconylrest enthält (fehlende Absorption bei 253 nm im Elutionsprofil!).

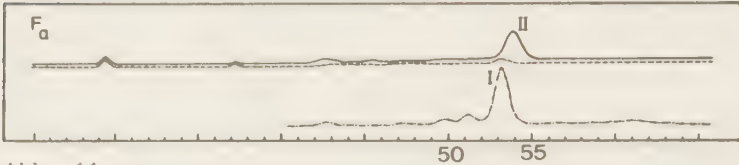


Abb. 11:

Analytische Anionenaustausch-Chromatographie (50 nMol) der Fraktion Fa (Abb. 10) auf 0,1 x 100 cm QAE-Sephadex A-25. Elution wie in der Legende zu Abb. 4 angegeben. Elutionsprofile (von oben nach unten): Transmission bei 253 nm, 280 nm (gestrichelt), Radioaktivität bei kontinuierlicher Messung mit dem Durchflußszintillationszähler.

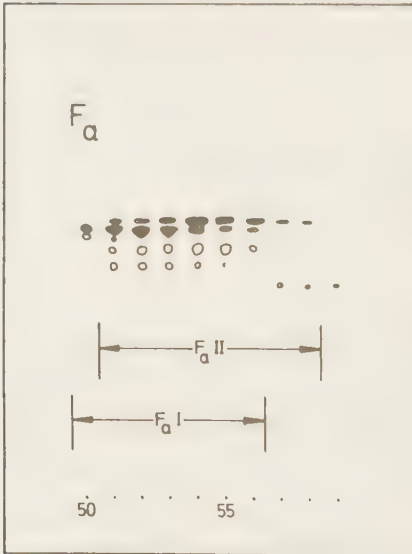


Abb. 12:

Analytische Dünnschicht-Chromatographie der Fraktionen 50-59 aus Abb. 11. Nachweis mit Fluorescamin.

Obwohl auch die Ionenaustausch-Chromatographie zu keiner vollständigen Trennung führt (Abb. 12), ermöglicht sie die Berechnung der Aminosäurezusammensetzung beider Peptide (Tab. 2). Aus Fraktion 56 (Abb. 12) ergibt sich eine weitgehend "reine" Analyse für das Hexapeptid Fa II. Das in Fraktion 50 überwiegende Peptid Fa I ist mit dem Peptid Fa II verunreinigt. Durch Subtraktion dieser Verunreinigung erhält man jedoch eine befriedigende Aminosäurezusammensetzung für das Peptid Fa I. Demnach ist Fa I ein Nonapeptid ohne Arginin, das ein Methionin und zwei Histidine enthält.

Brosemer und Kuhn (25) fanden bei der Spaltung der GDH mit Carboxypeptidase als C-terminale Aminosäure Methionin, als vorletzte Histidin. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß es sich bei Fa I um das C-terminale Peptid der GDH handeln könnte.

Gestützt auf diese Annahme wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet und das Peptidgemisch (Fa I + Fa II) = Fa mit Bromcyan behandelt. Die Aminosäureanalyse nach der Bromcyan-Behandlung (Tab. 3) zeigt als einzigen Unterschied zur Analyse des unbehandelten Peptidgemisches die Entstehung von Homoserin aus Methionin, wie es für ein Peptid mit C-terminalem Methionin zu erwarten ist.

Deshalb wurde versucht, dieses Peptid über sein C-terminales Homoserinlacton aus dem Peptidgemisch heraus selektiv an Aminopropylglas anzukoppeln (Abb. 13). Diese Ankopplung erfolgte mit einer Ausbeute von rund 30 %. Mit der in einem analytischen Versuch gekoppelten Menge von 30 nMol wurde das Peptid am Festkörper automatisch sequenziert.

Tab. 2:

Aminosäureanalysen der Fraktionen Fa I und Fa II aus der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie (Abb. 11 und 12)

	Fa I	Fa II		Fa I korr.	
Aminosäuren (Mol/Mol Peptid)					
CM-Cys	0,79	0,06		0,79	1
Asx	1,10	0,18		1,10	1
Thr	0,06	-		0,06	
Ser	0,19	0,06		0,19	
Glx	2,75	1,39	1	2,28	2
Pro	1,00	0,17		1,00	1
Gly	0,58	0,19		0,58	
Ala	0,94	1,89	2	-	
Val	0,62	1,07	1	0,15	
Met	0,63	0,06		0,63	1
Ile	0,27	0,08		0,27	
Leu	1,02	0,17		1,02	1
Tyr	0,14	-		0,14	
Phe	0,32	0,95	1	-	
Lys	0,53	1,09	1	0,06	
His	1,88	0,14		1,88	2
Arg	-	-		-	
Einsatz- menge (nMole)	0,50	1,13			

Fa I korr. = korrigierte Aminosäureanalyse der Fraktion
Fa I nach Subtraktion des Anteils von Fa II
(bezogen auf 0,94 = 2 Ala)

Tab. 3:

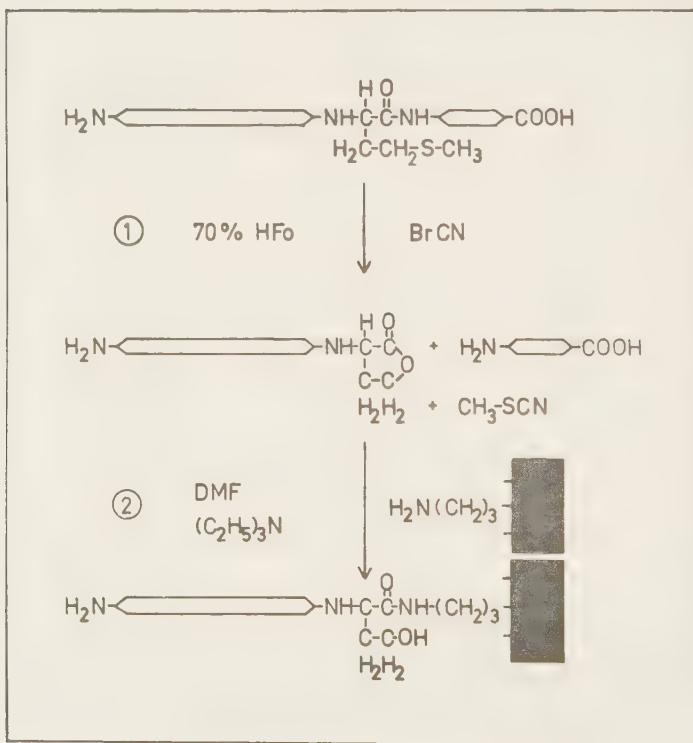
Aminosäureanalysen der präparativen Fraktion Fa vor (Fa) und nach der Bromcyan-Behandlung (Fa-BrCN)

	Fa	Fa-BrCN	
Aminosäuren (Mol/Mol Peptid)			
CM-Cys	0,62	0,88	1
Asx	0,99	0,99	1
Thr	0,11	0,09	
Ser	0,23	0,40	
HSe	-	0,18	1
Glx	2,04	2,03	2
Pro	0,91	1,02	1
Gly	0,55	0,53	
Ala	0,44	0,36	
Val	0,32	0,21	
Met	0,71	0,08	
Ile	0,24	0,14	
Leu	0,98	0,99	1
Tyr	-	0,05	
Phe	0,23	0,18	
Lys	0,41	0,19	
His	2,08	1,88	2
Arg	-	0,10	
Einsatzmenge (nMole)	0,26	1,12	

Abb. 13:

Ankopplung von Peptiden mit C-terminalem Homoserin an Aminopropylglas.

Bei der Bromcyanspaltung (1) von Methionylbindungen entstehen Peptide mit C-terminalem Homoserin. Dieses steht im Gleichgewicht mit seinem Lacton und wird durch Behandlung mit wasserfreier Trifluoressigsäure vollständig in das Lacton übergeführt. Bei der Aminolyse des Lactons durch die Aminopropylgruppen des Glases wird das Peptid über eine Säureamidbindung an den Träger fixiert (2).



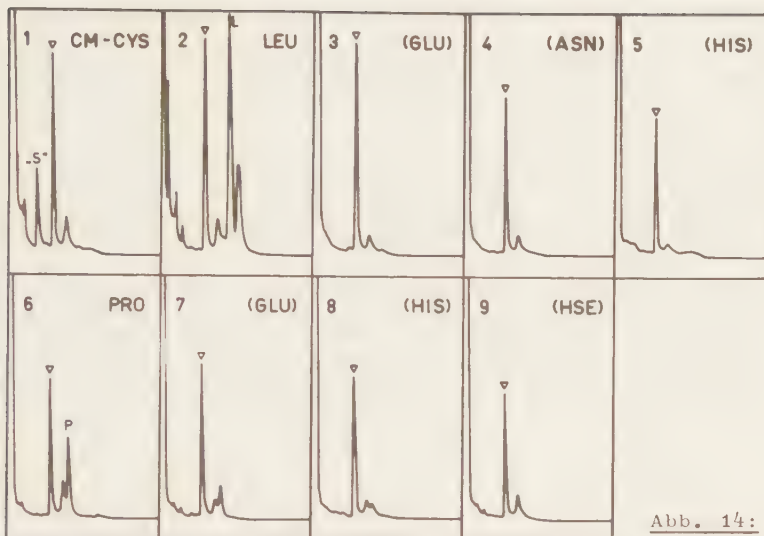
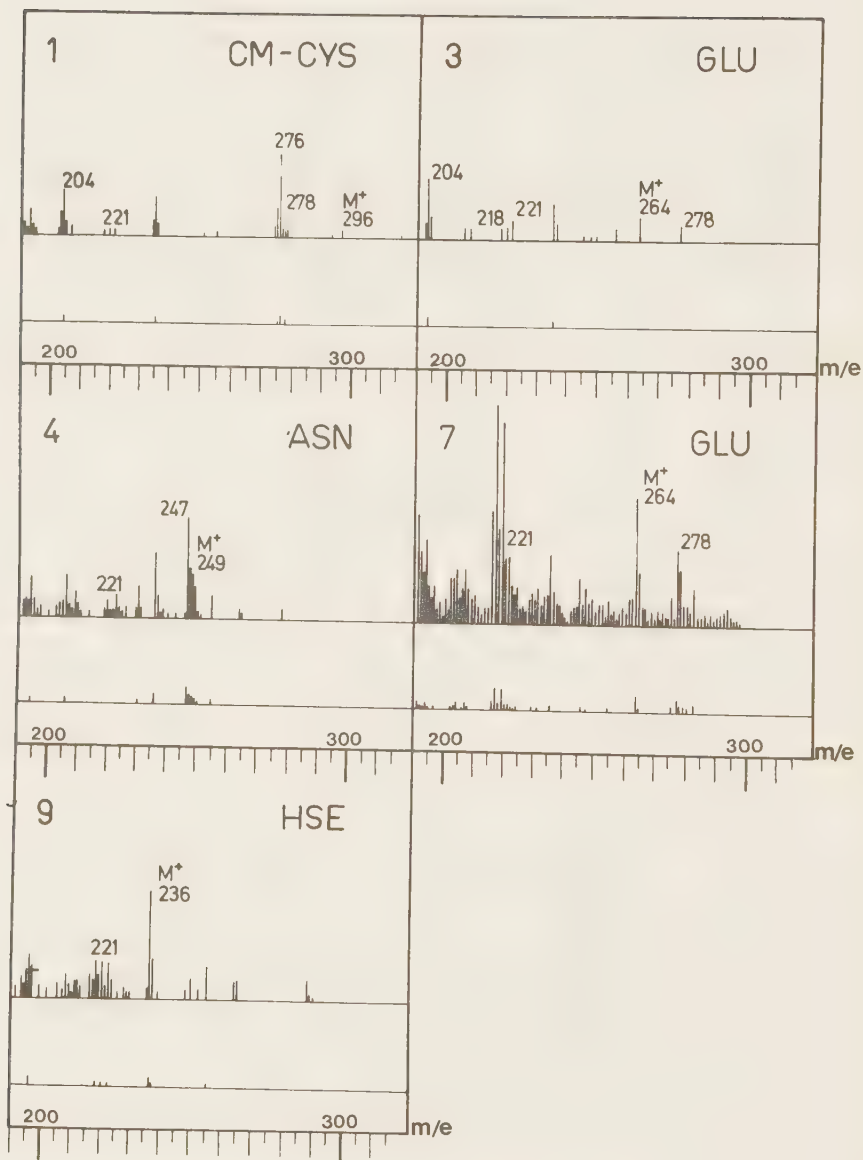


Abb. 14:

Gaschromatogramme der PTHs vom Festphasen-Abbau des Peptids Fa I an Aminopropylglas. Shimadzu GC-GA mit schwefelspezifischem flammenphotometrischen Detektor. Isothermer Lauf bei 190 °C. Injektion von je 1/20 der Probe, entsprechend einer Menge von rund 0,5 nMol PTH-Leu im Schritt 2. Der Peak des als Standard zugesetzten PTH- α -Aminobuttersäure ist mit ▽ gekennzeichnet.

Abb. 14 zeigt die Gaschromatogramme zur Identifizierung der Phenylthiohydantoine (PTHs) aus diesem Abbau. Dabei wurde ein schwefelspezifischer flammenphotometrischer Detektor verwendet (26), dessen Nachweisgrenze bei 1 pMol PTH liegt. PTH-CM-Cys ergibt im Gaschromatogramm den gleichen Peak wie PTH-Ser und wurde durch seine ^{14}C -Markierung sowie durch Massenspektrometrie (s.u.) nachgewiesen. Schritt 2 liefert in der Gaschromatographie Leu, Schritt 6 Pro. Die in der isothermen Gaschromatographie bei 190 °C "leeren" Positionen 3,4,7 und 9 wurden durch Massenspektrometrie als Glu, Asn, Glu und Homoserin bestimmt (Abb. 15). In den Positionen 5 und 8 wurde bei der



Aminosäureanalyse nach Rückhydrolyse eindeutig His gefunden.

Daraus ergibt sich für das Peptid Fa I folgende Sequenz:

Cys - Leu - Glu - AsN - His - Pro - Glu - His - Met

Aufgrund dieser Sequenz darf angenommen werden, daß Fa I das C-terminale Ende der GDH-Untereinheit bildet (siehe Diskussion).

Abb. 15:

Massenspektren vom Festphasen-Abbau des Peptids Fa I an Aminopropylglas.

Strichdarstellung der aufgezeichneten Intensitäten für den Massenbereich (m/e) 190-320. Die Empfindlichkeit der übereinander gezeichneten Registrierungen unterscheidet sich um den Faktor 10. M^+ =Molekularion. 221 ist die Masse des Molekularion des als Standard zugesetzten PTH- α -Aminobuttersäure.

Schritt 1: PTH-CM-Cys wird durch sein Molekularion (296) und ein charakteristisches Fragment (276) identifiziert.

Schritt 3 und Schritt 7: Neben dem Molekularion von PTH-Glu (264) findet sich das Molekularion des Methyl-esters (278), der bei der Aufarbeitung der Proben in Methanol entsteht.

Schritt 4: Aus unbekannten Gründen entstand neben dem in geringer Ausbeute auftretenden Molekularion (249) das (M-2)-Fragment (247).

Schritt 9: PTH-Homoserin ergibt das gleiche Molekularion (236) wie PTH-Thr, das hier aufgrund der Aminosäureanalyse auszuschließen ist.

2.3. Fraktion C + D

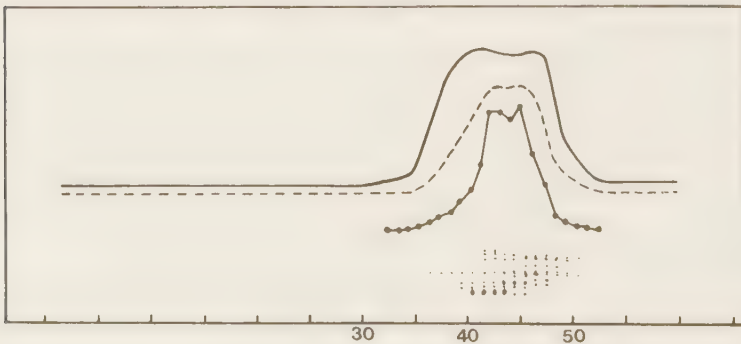
Die Fraktionen C und D der primären Gelchromatographie (Abb. 3) wurden vereinigt und zusammen auf Bio-Gel P-30 rechromatographiert (Abb. 16).

Wie die analytische Dünnschichtchromatographie (Abb. 17) zeigt, handelt es sich um ein komplexeres Peptidgemisch, das mindestens 3 Hauptkomponenten enthält. Deshalb wurde, zunächst im analytischen Maßstab, eine Trennung auf dem Anionenaustauscher QAE-Sephadex versucht (Abb. 18).

In den Elutionsprofilen heben sich besonders ein Peak mit hoher 253 nm-Absorption (IV) und ein stark radio-

Abb. 16:

Präparative Rechromatographie der vereinigten Fraktionen C + D auf 0,8 x 150 cm Bio-Gel P-30 in 0,1 M Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6 (1,8 ml/h). Elutionsprofile (von oben nach unten): Transmission bei 253 nm, 280 nm (gestrichelt) und Radioaktivität der halbstündigen Fraktionen.



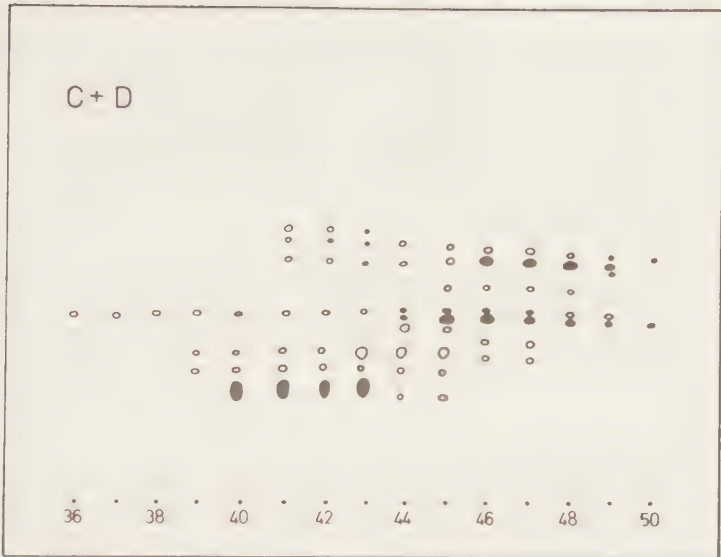
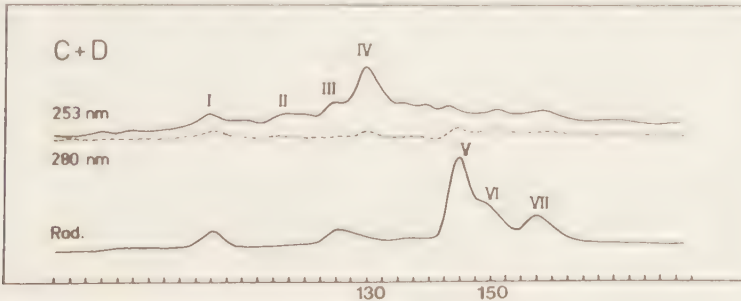


Abb. 17:

Analytische Dünnschichtchromatographie der Fraktionen 36-50 aus der Rechromatographie von C + D auf Bio-Gel P-30 (Abb. 16). Nachweis mit Fluorescamin.

Abb. 18:

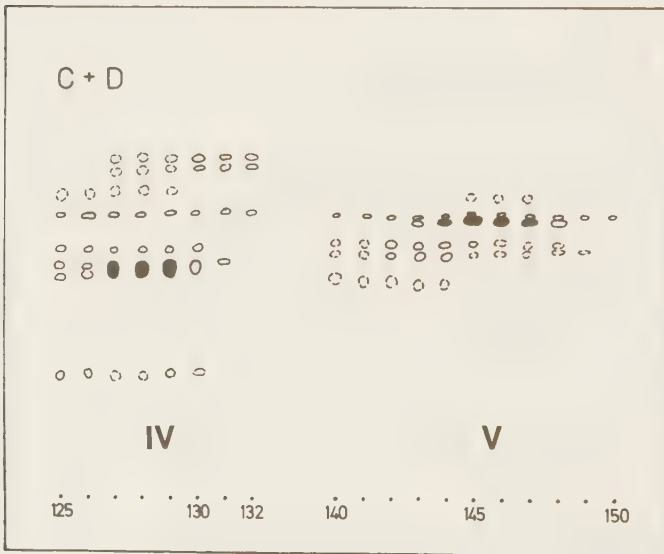
Anionenaustausch-Chromatographie der Gelfraktion C + D auf QAE-Sephadex A-25. Analytische Chromatographie von 50 nMol auf einer 0,1 x 100 cm-Säule. Elution wie in der Legende der Abb. 4 angegeben. Elutionsprofile (von oben nach unten): Transmission bei 253 nm, 280 nm (gestrichelt), darunter Radioaktivität (Rad.), gemessen im Durchfluß-Szintillationszähler.



aktiver Peak (V) hervor. Auf der Dünnschichtplatte ist zu erkennen, daß diese Peaks jeweils eine Hauptkomponente der Fraktion C + D enthalten (Abb. 19). Die Fraktionen IV und V wurden in präparativem Maßstab hergestellt (Abb. 20) und weiter untersucht.

Abb. 19:

Dünnschicht-Chromatographie der Fraktionen 125-130 bzw. 140-150 aus der analytischen Trennung von C + D auf QAE-Sephadex (Abb. 18). Nachweis mit Fluorescamin. Die Hauptkomponenten sind durch schwarze Flecken dargestellt.



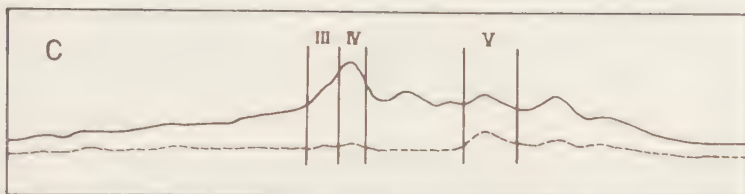


Abb. 20:

Präparative Anionenaustausch-Chromatographie der Fraktion C + D (Abb. 17) auf 0,2 x 100 cm QAE-Sephadex. Elution wie in der Legende zu Abb. 7 angegeben. Elutionsprofile: Transmission bei 253 nm und 280 nm (gestrichelt).

2.3.1. Peptid C IV

Die Aminosäureanalyse der Fraktion IV (Tab. 4) läßt erkennen, daß die darin enthaltene Hauptkomponente noch verunreinigt ist. Als N-terminale Aminosäure wurde neben Thr etwas Ala gefunden.

Das Peptid enthält ein Methionin als Angriffspunkt für eine Bromcyanspaltung. Deshalb wurden zunächst keine weiteren Reinigungsschritte durchgeführt. Das Peptid wurde in 70 % Ameisensäure deblockiert und mit Bromcyan gespalten. Die Spaltprodukte wurden an Bio-Gel P-4 in Ammoniumacetatpuffer pH 4,8 aufgetrennt (Abb. 21) und durch Dünnschicht-Chromatographie (Abb. 22), Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren sowie durch Aminosäureanalysen charakterisiert.

An der vorderen Ausschlußgrenze (Fraktionen 44-46) wird ein Peptid eluiert, das mit Thr beginnt und das nach sei-

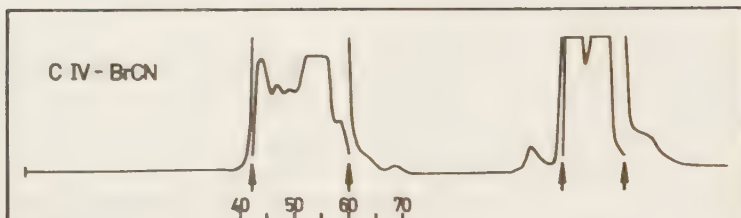
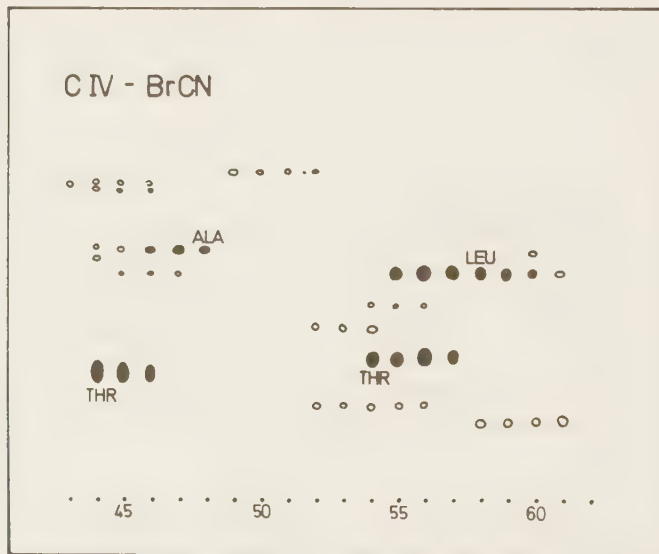


Abb. 21:

Gelchromatographie der Bromcyan-Fragmente von C IV (300 nMol) auf 0,4 x 150 cm Bio-Gel P-4 in 50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4,8 (1,2 ml/h). Extinktion bei 225 nm, Bereich 0 - 0,5 E. An den mit Pfeilen bezeichneten Stellen wurde in den Bereich 0 - 1,0 E umgeschaltet. Analytische Dünnschicht-Chromatographie der 20-min-Fractionen 43-62 siehe Abb. 22.

Abb. 22:

Analytische Dünnschicht-Chromatographie der Fractionen 43-62 aus Abb. 21. Nachweis mit Fluorescamin. Für die Hauptkomponenten (schwarz ausgefüllte Banden) sind die mit der Dansyl-Technik bestimmten N-terminalen Aminosäuren angegeben.



ner Aminosäurezusammensetzung (Tab. 5) mit dem ungespaltenen Peptid IV identisch ist. Neu entstehen durch die Bromcyanspaltung zwei kleinere Fragmente mit den N-terminalen Aminosäuren Thr (Fraktionen 54-57, C IV a) bzw. Leu (Fraktionen 55-61, C IV b). Aus den Aminosäureanalysen geht hervor (Tab. 5), daß diese beiden Bromcyanfragmente zusammen das Peptid IV ergeben. IV a ist das mit Thr beginnende N-terminale Fragment, das mit Homoserin endet, IV b ist das C-terminale Argininpeptid. Bei der Gelchromatographie wird auch eine mit Ala beginnende verunreinigende Komponente (Fraktionen 45-48) abgetrennt.

Die bei der Bromcyanspaltung entstehenden Fragmente IV a und IV b sind von ähnlicher Größe und trennen sich bei der Gelchromatographie nur unvollständig. Anstelle weiterer Versuche zur Trennung der Fragmente wurde von der Möglichkeit der selektiven Ankopplung des Homoserinpeptids an Aminopropylglas Gebrauch gemacht.

Das zur Ankopplung erforderliche Homoserinlacton würde auch mit dem Ammoniak reagieren, der aus Resten des zur Chromatographie benutzten Ammoniumacetatpuffers freigesetzt wird. Um die restlichen Ammoniumionen abzutrennen, wurde zunächst das Peptidgemisch IV a und IV b (Fraktionen 54-57 in Abb. 22) in 30 % Essigsäure auf Bio-Gel P-2 rechromatographiert.

Wie die Dünnschicht-Chromatographie der Fraktionen zeigt (Abb. 23), wird bei dieser Gelchromatographie das mit Leu beginnende Argininpeptid zuerst eluiert. Wie an Bio-Gel P-4 in Ammoniumacetatpuffer wird jedoch auch hier keine vollständige Trennung erzielt.

Tab. 4:

Aminosäureanalysen der Fraktion IV aus der Anionenaustausch-Chromatographie auf QAE-Sephadex

	analytisch (Abb. 18)	präparativ (Abb. 20)	
Aminosäuren (Mol/Mol Peptid)			
Asx	1,22	1,32	1
Thr	1,51	1,56	1-2
Ser	0,97	1,36	1
Glx	6,08	5,94	6
Pro	1,23	1,06	1
Gly	3,12	3,22	3
Ala	1,20	1,26	1
Val	0,57	0,59	0-1
Met	0,81	0,78	1
Ile	1,41	1,26	1-2
Leu	3,08	2,84	3
Tyr	-	0,05	-
Phe	0,48	0,43	0-1
Lys	2,72		3
His	0,31		-
Arg	0,73		1
Einsatzmenge (nMole)	0,35		0,35

Tab. 5:

Aminosäureanalysen der Bromcyan-Fragmente des Peptids C IV aus der Gelchromatographie auf Bio-Gel P-4 (Abb. 21 und 22)

	C IV a Fr. 24	C IV b Fr. 20	C IV b korr. Fr. 20	
Aminosäuren (Mol/Mol Peptid)				
Asx	0,11	0,96	1,00	1
Thr	0,80 1	0,90	0,64	1
Ser	0,84 1	0,34	0,06	
HSe	+ 1			
Glx	3,91 4	3,36	2,30	2-3
Pro	0,23	0,91	0,94	1
Gly	1,11 1	2,20	1,98	2
Ala	0,11	1,00	1,04	1
Val	0,11	0,28	0,29	
Ile	0,92 1	0,36	0,08	
Leu	0,98 1	0,07	0,08	
Tyr	0,02	0,07	0,08	
Phe	0,06	0,24	0,25	
Lys	1,94 2	1,57	1,04	1
His		0,20	0,21	
Arg	0,10	1,00	1,00	1
Einsatzmenge (nMole)	1,59	1,85	1,78	

C IV b korr. = korrigierte Analyse von C IV b nach Subtraktion der Verunreinigung

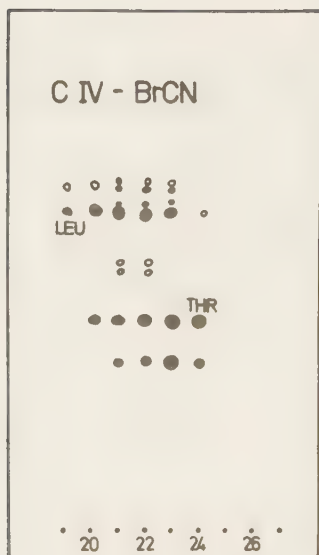


Abb. 23:

Dünnschichtchromatographische Analyse der Fraktionen 19-27 aus der Rechromatographie der Bromcyanfragmente IV a + IV b auf Bio-Gel P-2 in 30 % Essigsäure.

Die Hauptkomponenten wurden durch ihre N-terminalen Aminosäuren charakterisiert. Das mit Thr beginnende Peptid tritt auf der Dünnschichtplatte in zwei verschiedenen Banden auf, die vermutlich der Homoserin- bzw. Homoserinlactonform des Peptids entsprechen.

Das Peptidgemisch (Fraktionen 19-24 in Abb. 23) wurde zur vollständigen Lactonisierung des Homoserins in wasserfreier Trifluoressigsäure inkubiert und nach dem Trocknen in Dimethylformamid/Triäthylamin zur Kopplungsreaktion mit Aminopropylglas versetzt. Nach sorgfältigem Waschen des Trägers wurde das kovalent gebundene Peptid im Festphasen-Sequenator automatisch sequenziert.

Die Identifizierung der PTHs erfolgte durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie. In den isothermen Gaschromatogrammen bei 190 °C wurden in Position 1 Thr, in Position 2 Gly, in Position 4 Ser, in Position 5 Ile und in Position 8 Leu nachgewiesen (Abb. 24). Isotherme Chromatogramme bei 230 °C ergeben in den Positionen 6,7,9 und

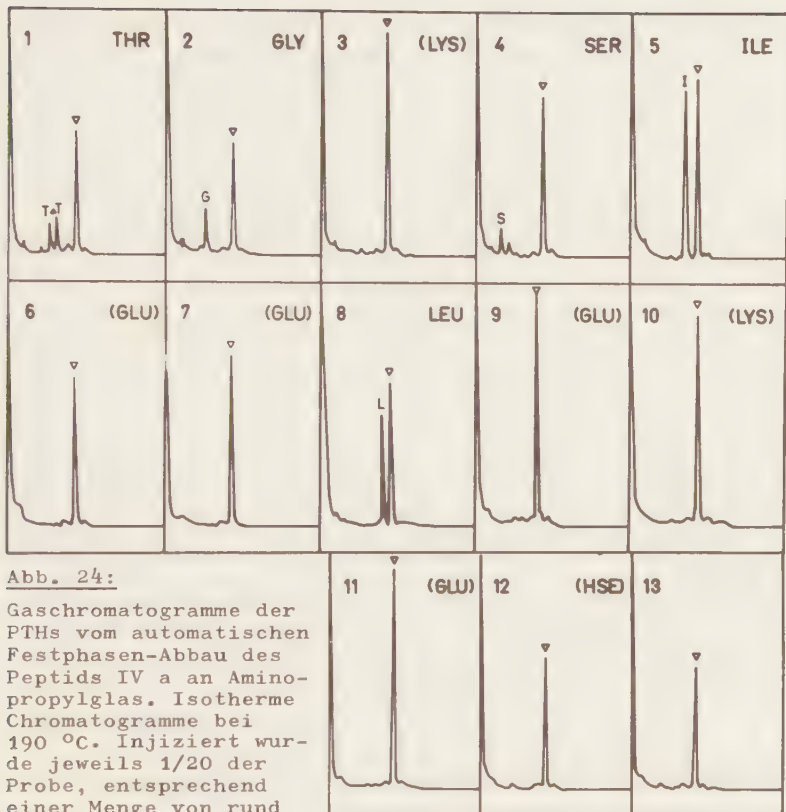


Abb. 24:

Gaschromatogramme der PTHs vom automatischen Festphasen-Abbau des Peptids IV a an Amino-propylglas. Isotherme Chromatogramme bei 190 °C. Injiziert wurde jeweils 1/20 der Probe, entsprechend einer Menge von rund 1,8 nMol PTH-Leu in Schritt 8. Mit einem Pfeil bezeichnet ist der interne Standard PTH-Norleucin. Beckman GC-45 mit Flammenionisationsdetektor. Vollausschlag 10^{-10} A.

11 jeweils PTH-Glutaminsäuremethylester (Abb. 25). Der Methylester entsteht bei der Aufarbeitung der Proben in Gegenwart von Methanol (vgl. D 6.1.) und ist als Nachweis für PTH-Glu anzusehen. Lysin in Position 10 und das C-terminale Homoserin in Position 12 wurden durch Massenspektrometrie nachgewiesen (Abb. 26).

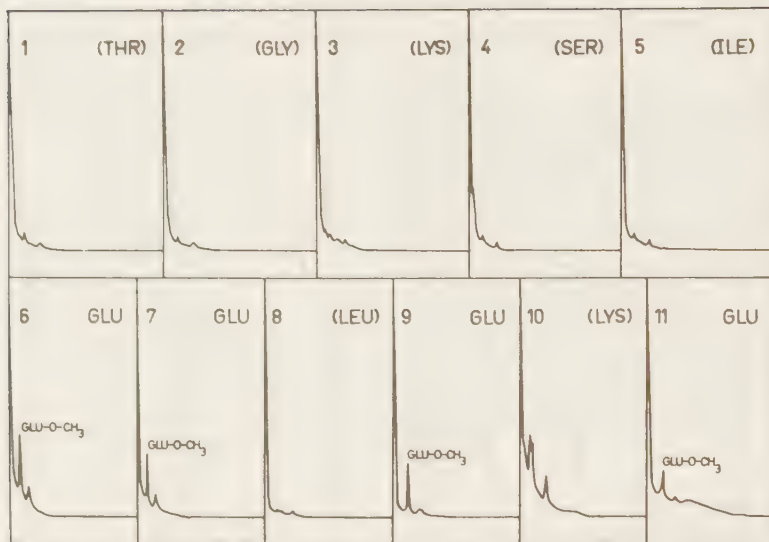


Abb. 25:

Gaschromatogramme der PTHs vom automatischen Festphasenabbau des Peptids IV a an Aminopropylglas. Isotherme Chromatogramme bei 230 °C von je 1/20 der Probe.

Glu-O-CH₃ = PTH-Glutaminsäuremethylester (s. Text)

Somit wurde für das Homoserinfragment IV a die Sequenz

Thr - Gly - Lys - Ser - Ile - Glu - Glu -
- Leu - Glu - Lys - Glu - HSe

bestimmt.

Der Rückstand nach Einrotieren des Reaktionsansatzes und der zum Waschen des Trägers benützten Flüssigkeiten wurde in 30 % Essigsäure auf Bio-Gel P-2 chromatographiert. Dabei wurde eine Fraktion gewonnen, die neben einem Rest von nicht gekoppeltem Homoserinfragment das C-terminale Argininpeptid IV b enthält.

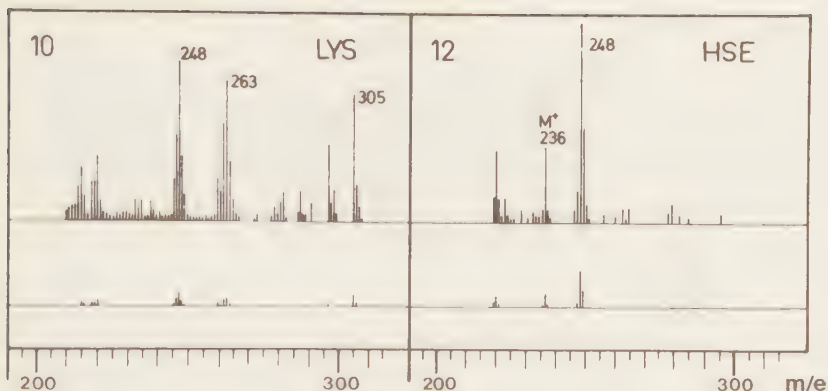


Abb. 26:

Massenspektren der Schritte 10 und 12 vom automatischen Festphasen-Abbau des Peptids IV a an Aminopropylglas.

Strichdarstellung der aufgezeichneten Intensitäten für den Massenbereich (m/e) 190-320. Die Empfindlichkeit der übereinander gezeichneten Registrierungen unterscheidet sich um den Faktor 10.

Schritt 10: ϵ -Phenylthiocarbamyl-Lysin-PTH liefert charakteristische Fragmente der Massen 305 ($M-\langle\bigcirc\rangle-NH_2$) und 263 ($M-\langle\bigcirc\rangle-N=C=S$)

Schritt 12: PTH-Homoserin ergibt ein Molekularion $M^+ = 236$. Das gleiche Molekularion entsteht aus PTH-Thr, das jedoch hier auszuschließen ist.

Das Ion der Masse 248 in beiden Schritten ist das Molekularion von PTH-Norleucin, das als Standard zugesetzt wurde.

Zur Spaltung des Argininpeptids IV b an seinem einzigen Lysinrest wurde die Fraktion mit Trypsin inkubiert. Die Spaltprodukte wurden durch eindimensionale Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel aufgetrennt (Abb. 27). Die beiden Hauptkomponenten, 7 und 8, wurden aus einer präparativen Dünnschichtplatte eluiert und in Mengen von 20 nMol gewonnen.

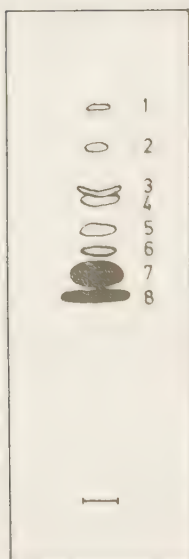


Abb. 27:

Dünnschicht-Chromatographie der tryptischen Spaltprodukte aus dem Rückstand nach selektiver Ankopplung des Homoserin-peptids IV a. Nachweis mit Fluorescamin. Die beiden stärksten Banden, 7 und 8, wurden durch präparative Dünnschicht-Chromatographie isoliert.

Die Aminosäureanalysen dieser Peptide (Tab. 6) sind durch Verunreinigung mit freien Aminosäuren (vor allem Glu und Gly) "verzerrt". Es ist jedoch klar zu erkennen, daß Bande 7 das C-terminale Arginin-peptid und Bande 8 das N-terminale Lysin-peptid enthält.

Mit der Dansyl-Edman-Technik wurden folgende Sequenzen bestimmt:

Peptid 7: Leu-Glx-Gly-Pro-Glx-Thr-Ala-Arg

Peptid 8: Leu-Asx-Gly-Glx-Lys

Auf eine Bestimmung der Säure- bzw. Amidfunktionen bei Asx und Glx durch enzymatische Spaltungen wurde wegen der geringen Mengen verzichtet. Sie ergibt sich aus der Einordnung der Peptide in bereits sequenzierte größere Fragmente (s. Diskussion).

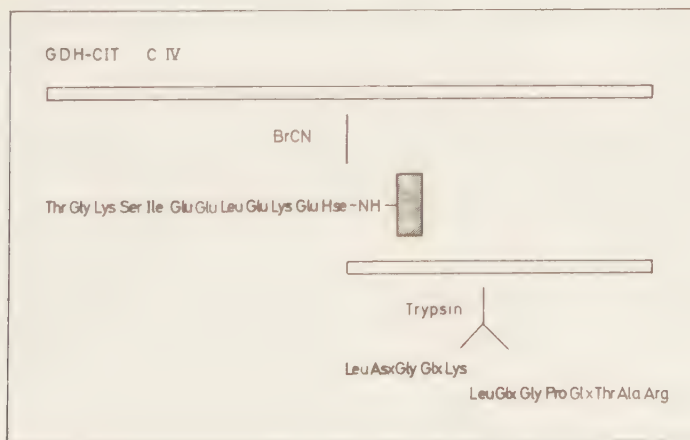
In Abb. 28 ist die bei der beschriebenen Sequenzierung des Peptids IV angewandte Strategie zusammenfassend dargestellt. Sie führt zu folgender Gesamtsequenz für das Peptid IV:

1
Thr - Gly - Lys - Ser - Ile - Glu - Glu - Leu - Glu -
10
- Lys - Glu - Met - Leu - Asx - Gly - Glx - Lys - Leu -
20
- Glx - Gly - Pro - Glx - Thr - Ala - Arg
25

Abb. 28:

Schematische Zusammenfassung der Strategie bei der Sequenzierung des Peptids C IV aus der citraconylierten GDH.

Nach Spaltung des (decitraconylierten) Peptids mit Bromcyan wurde das N-terminale Homoserinpeptid selektiv an Aminopropylglas gekoppelt und automatisch sequenziert. Das zurückbleibende C-terminale Argininpeptid wurde mit Trypsin gespalten. Die beiden tryptischen Peptide wurden getrennt und mit der Dansyl-Edman-Technik manuell sequenziert.



Tab. 6:

Aminosäureanalysen der tryptischen Spaltprodukte des Peptids IV b aus der präparativen Dünnschicht-Chromatographie (Abb. 27).

	Peptid 7		Peptid 8	
Aminosäuren (Mol/Mol Peptid)				
Asx	0,35		1,16	1
Thr	1,01	1	0,16	
Ser	0,44		0,44	
Glx	2,26	2	1,46	1
Pro	0,84	1	-	
Gly	1,63	1	1,64	1
Ala	0,93	1	0,28	
Val	0,24		0,05	
Ile	0,18		-	
Leu	0,90	1	1,00	1
Phe	0,12		-	
Lys	0,51		1,00	1
Arg	1,00	1	+	
Einheit (nMol)				
	0,59		0,25	

2.3.2. Peptid C V

Fraktion V der präparativen Anionenaustausch-Chromatographie (Abb. 20) wurde zur Deblockierung der Lysinreste in 30 % Ameisensäure inkubiert. Dabei trat ein Sediment auf, das in Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6 wieder löslich war und in diesem Puffer auf Bio-Gel P-2 chromatographiert wurde.

Dadurch wurde ein Peptid mit der einheitlichen Endgruppe Ala isoliert, dessen Aminosäurezusammensetzung Tab. 7 zeigt. Das Peptid enthält neben drei radioaktiven CM-Cys ein Lysin, aber kein Arginin. Mit der Dansyl-Edman-Methode wurde die N-terminale Teilsequenz

Ala - Lys - Leu - Phe - ...

ermittelt.

Übereinstimmend mit dieser Sequenz wurde nach tryptischer Spaltung des Peptids in der Gelchromatographie ein fast gleich großes Fragment mit der Endgruppe Leu gefunden. In der Aminosäureanalyse dieses Fragments ist kein Lysin mehr nachweisbar.

Diese Befunde ermöglichten eine eindeutige Zuordnung des Peptids C V zu einem bereits sequenzierten Bromcyanpeptid der GDH (s. Diskussion).

Tab. 7:

Aminosäurezusammensetzung des Peptids C V
(Abb. 18, 19 und 20)

Peptid C V		
Aminosäuren (Mol/Mol Peptid)		
CM-Cys	2,65	3
Asx	1,42	1-2
Thr	3,46	3-4
Ser	3,50	3-4
Glx	1,72	2
Pro	2,10	2
Gly	2,55	2-3
Ala	3,11	3
Val	2,64	3
Ile	1,38	1-2
Leu	2,97	3
Tyr	1,09	1
Phe	2,00	2
Lys	0,91	1

C. Diskussion

Die Isolierung von Peptiden aus komplexen Peptidgemischen ist sehr aufwendig. Deshalb wurde versucht, die zur Überlappung der Bromcyanpeptide notwendigen methioninhaltigen Sequenzabschnitte in wenigen großen Fragmenten zu gewinnen.

Um die zur Aneinanderreihung der Bromcyanpeptide notwendige Information zu erhalten, müssen solche Fragmente nicht mehr ganz sequenziert werden. Es genügen vielmehr kurze Partialsequenzen vor und hinter den Methioninresten. Diese Sequenzen können mit der Solid-Phase-Methode auf besonders einfache Weise bestimmt werden (Abb. 29): Das methioninhaltige Peptid wird an der Methionylbindung mit Bromcyan gespalten. Das N-terminale Spaltstück wird über sein Homoserinlacton an Aminopropylglas gekoppelt und über einige Schritte automatisch sequenziert. Nur wenn das Überlappungspeptid mehrere Methioninreste enthält, müssen die Bromcyanfragmente vorher aufgetrennt werden. Im Kopplungsansatz bleibt das C-terminale Spaltstück zurück und wird anschließend mit manuellen Methoden oder mit der Solid-Phase-Methode ansequenziert. Zur Festlegung der Reihenfolge von bereits vollständig sequenzierten Bromcyanpeptiden dürften im allgemeinen wenige Sequenzpositionen genügen. Andererseits können durch die automatische Sequenzierung der N-terminalen Bromcyanfragmente von Überlappungspeptiden die Sequenzen der primären Bromcyanpeptide abgesichert bzw. vervollständigt werden (27).

Die GDH-Untereinheit enthält 28 Lysin- und 8 Argininreste (13). Besonders geeignet zur Gewinnung größerer Fragmente

erscheint daher eine Beschränkung der tryptischen Spaltung auf die Arginylbindungen durch Blockierung der Lysinreste.

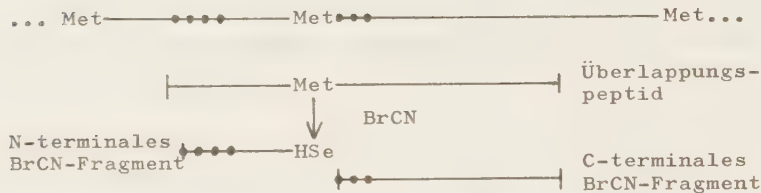


Abb. 29:

Schema der Verknüpfung von Bromcyanpeptiden durch partielle Sequenzierung von methioninhaltigen Überlappungspeptiden (Erklärung s. Text).

Wie Abb. 30 am Beispiel einer Dehydrogenase bekannter Primärstruktur zeigt, sind dabei Peptide zu erwarten, deren Molekulargewichte sich ähnlich verteilen wie die der primären Bromcyanpeptide. Solche Peptide sollten in den meisten Fällen allein durch Gelchromatographie zu isolieren sein (27).

Das bei der tryptischen Spaltung der Lysin-blockierten GDH entstehende Peptidgemisch erwies sich jedoch als erheblich komplexer, so daß zur Isolierung von Peptiden auch die Ionenaustausch-Chromatographie herangezogen werden mußte. Im Gegensatz zu den z. T. schwer löslichen Bromcyanpeptiden (G. Rückl, Dissertation, in Vorber.) sind die citraconylierten tryptischen Peptide der GDH sehr gut löslich und können im alkalischen pH-Bereich auf Anionenaustauschern chromatographiert werden.

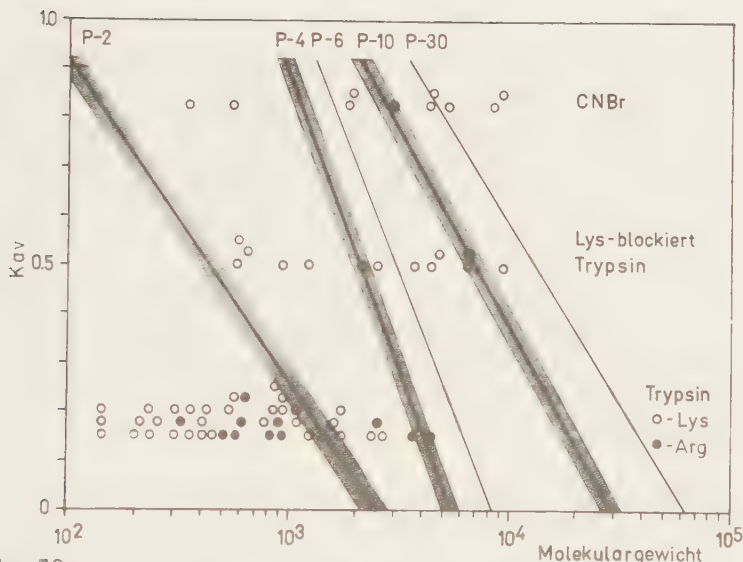


Abb. 30:

Theoretisch zu erwartende Peptide der Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (Sequenz, 28) durch Bromcyanspaltung ("CNBr"), tryptische Spaltung nach Blockierung der Lysinreste ("Lys-blockiert Trypsin") bzw. tryptische Spaltung ("Trypsin").

Die Peptide sind entsprechend ihren Molekulargewichten (logarithmischer Maßstab) als Kreise eingetragen (tryptische Peptide mit C-terminalem Arginin als ausgefüllte Kreise).

Weiterhin zeigt das Diagramm die "Kennlinien" verschiedener Bio-Gele für die Abhängigkeit des Elutionskoeffizienten K_{av} vom Molekulargewicht. Peptide, die weiter voneinander entfernt sind als die Breite der gerasteren Bänder entlang der "Kennlinien", können auf den entsprechenden Bio-Gelen voneinander getrennt werden (27).

$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_f - V_o)$; V_e = Elutionsvolumen;
 V_o = Ausschlußvolumen ; V_f = gesamtes freies Volumen;

Die Gel- und Anionenaustausch-Chromatographie wurde auf Säulen kleinen Durchmessers (1 mm bis 8 mm) durchgeführt. Das verwendete System zur analytischen und präparativen Säulenchromatographie von Peptiden (27,29,30) hat sich

bereits bei der Isolierung von tryptischen Peptiden der GDH (18,19) sowie bei der Gelchromatographie der Bromcyanpeptide in organischen Säuren (27; G. Rückl, Dissertation, in Vorber.) bewährt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es erstmals zur Anionenaustausch-Chromatographie längerer Peptide (z.B. der Fraktion C) eingesetzt.

Die Löslichkeit der citraconylierten Peptide gestattet die Anwendung von Elutionspuffern ohne störende UV-Absorption. Daher konnten die Möglichkeiten zur Detektion von Peptiden durch UV-Photometrie (vgl. C 4.1.) voll ausgeschöpft werden.

Infolge der starken Absorption des Citraconylrestes ($\epsilon_{250 \text{ nm}} = 2,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{220 \text{ nm}} = 20,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) konnten in analytischen Chromatographien die citraconylierten Peptide sehr empfindlich nachgewiesen werden (vgl. z.B. Abb. 3,11,18). Dabei wurde auch die Radioaktivität der ^{14}C -Carboxymethylcystein-Reste mit Hilfe eines Durchfluß-Szintillationszählers kontinuierlich gemessen und als Elutionsprofile aufgezeichnet. Die Zähl- ausbeute lag bei 10 %. Um die gleiche Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, müßte für die diskontinuierliche Zählung im Flüssigkeits-Szintillationszähler ein Aliquot von 15 % jeder Fraktion eingesetzt werden. Bei der Durchfluß-Messung bleibt die gesamte Peptidmenge für nachfolgende analytische Untersuchungen erhalten. Störend ist die mitunter starke Adsorption von Peptiden an das Szintillationsmaterial. Deshalb wurde bei der präparativen Chromatographie auf die kontinuierliche Radioaktivitätsmessung verzichtet.

Die in dieser Arbeit beschriebene Isolierung von Peptiden ging von 1 μMol citraconylierter GDH-Untereinheit aus.

Die beiden methioninhaltigen Peptide (C IV, Fa I) wurden in Mengen von rund 300 nMol gewonnen. Wegen der unerwartet komplexen Elutionsprofile bei der Anionenaustausch-Chromatographie (vgl. Abb. 4) wurden im Rahmen dieser Arbeit nur einige Fraktionen im Bereich der kleineren Molekulargewichte eingehender untersucht. Dabei ergaben sich Hinweise auf die mögliche Hauptursache der Komplexität. Obwohl zur tryptischen Spaltung ein allgemein anerkanntes TPKC-behandeltes (31) Trypsin-Präparat verwendet wurde, enthielten bereits die untersuchten Fraktionen zwei Peptide, die in fast quantitativer Ausbeute durch Spaltungen chymotryptischer Spezifität entstanden sein müssen.

Das Peptid E I ist Teilstück eines bereits sequenzierten Bromcyanpeptids (G. Rückl, Dissertation, in Vorber.) und wurde demnach aus dem citraconylierten Protein durch Spaltung zwischen einem Tyrosinrest und einem citraconylierten Lysinrest freigesetzt:

...-Tyr-Lys-Val-Cys-Tyr----- Aminosäuren -----Arg-Cys-...

Dem Peptid C V liegen sogar zwei "chymotryptische" Spaltstellen hinter Phe bzw. Tyr zugrunde:

...-Phe-Ala-Lys-Leu-Phe-----22 Aminosäuren---
---Cys-X-Pyr-X-Arg-...

Derartige "chymotryptische" Spaltstellen würden zumindest zum Teil auch die Komplexität im Bereich der größeren Fragmente erklären. Ob es sich um eine restliche Verunreinigung des verwendeten Trypsins mit Chymotrypsin handelt oder um besondere Spezifitäten des Trypsins an der GDH-Sequenz, kann aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Befunde nicht entschieden werden (vgl. dazu 32).

Zwei der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Peptide enthalten jeweils ein Methionin.

Das aus 25 Aminosäuren bestehende Peptid C IV enthält in Position 12 einen Methioninrest und ist somit ein typisches Überlappungspeptid für zwei primäre Bromcyanpeptide. Dieses Peptid wurde mit der eingangs skizzierten Strategie vollständig sequenziert: Die Positionen 1-12 wurden durch automatischen Abbau mit der Solid-Phase-Methode bestimmt; zur Sequenzierung der Positionen 13-25 wurde die manuelle Dansyl-Edman-Technik angewendet.

Die Sequenz des Überlappungspeptids C IV ermöglicht die Aneinanderreihung von zwei Bromcyanpeptiden, deren Sequenzen vollständig bzw. weitgehend bekannt sind (G.Rückl, Dissertation, in Vorber.). Das erste Bromcyanpeptid, C₁, ist 56 Aminosäuren lang. Es ist in den Positionen 1-30 sowie in seinem C-terminalen Teil in den Positionen 45-56 sequenziert. Das zweite Bromcyanpeptid, D_{1,2}, besteht aus 32 Aminosäuren und ist vollständig sequenziert. Die Überlappung dieser beiden primären Bromcyanpeptide durch das Peptid C IV ist in Abb. 31 schematisch dargestellt.

Die unabhängig voneinander bestimmten Sequenzen im Bereich der Überlappung stimmen überein. Lediglich auf eine getrennte Bestimmung der Amidfunktion (Asx, Glx) im C-terminalen Bromcyanfragment von C IV wurde verzichtet. Nach vollständiger Sequenzierung des Bromcyanpeptids C₁ führt die Überlappung der beiden primären Bromcyanpeptide zu einer zusammenhängenden Sequenz von 86 Aminosäuren.

Das zweite methioninhaltige Peptid stellt einen Sonderfall dar, weil in diesem Peptid das Methionin C-terminal ist.

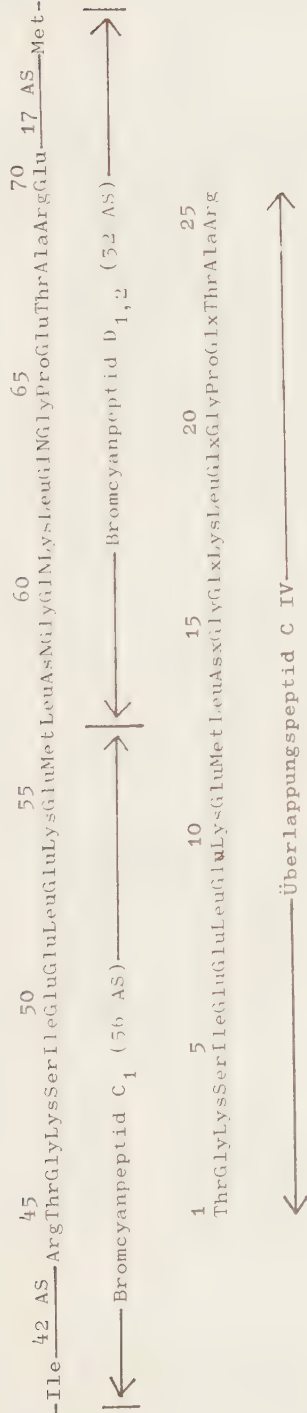


Abb. 51: Schema der Verknüpfung der beiden primären Bromocyanpeptide C_1 und $D_{1,2}$ der GDH durch das methioninhaltige Überlappungspeptid C IV.

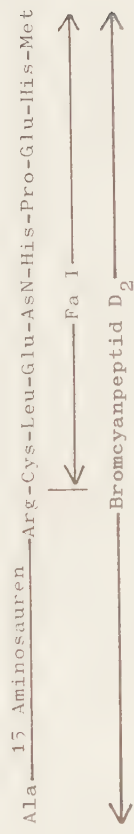


Abb. 52: Identifizierung des C-terminalen Bromocyanpeptids der GDH mit Hilfe des methioninhaltigen Peptids Fa I.

Schließt man eine "chymotryptische" Spaltung hinter Methionin aus, so kann ein solches Peptid nur am C-Terminus der GDH-Untereinheit stehen. Nun ist nach den weiter oben diskutierten Befunden eine "chymotryptische" Spaltung hinter Methionin keineswegs auszuschließen. Aufgrund der Ergebnisse von Brosemer und Kuhn (25) über die C-terminalen Aminosäuren der GDH-Untereinheit (Met als letzte, His als vorletzte Aminosäure) ist es jedoch sehr wahrscheinlich, daß es sich bei Fa I tatsächlich um das C-terminale Peptid handelt. Unter dieser Annahme wird das bereits sequenzierte Bromcyanpeptid D₂ (G. Rückl, Dissertation, in Vorber.), das die Sequenz von Fa I enthält, als C-terminales Bromcyanpeptid der GDH-Untereinheit identifiziert (Abb. 32).

Durch die im Rahmen dieser Arbeit isolierten und sequenzierten Peptide werden somit 2 der 9 Bromcyanpeptide überlappt und eines als C-Terminus charakterisiert. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß die Strategie zur Gewinnung von methioninhaltigen Überlappungspeptiden durch Spaltung von Arginylbindungen grundsätzlich brauchbar ist, wenn es gelingt, unspezifische "chymotryptische" Spaltungen zu vermeiden. Dies könnte durch Verwendung besser gereinigter Trypsinpräparate oder durch Spaltung mit Clostripain (33) geschehen.

D. Experimenteller Teil

1. Material

1.1. Reagenzien und Lösungsmittel

Herkunft und Reinheit der verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel werden in den entsprechenden Arbeitsvorschriften angegeben. Soweit nicht anders vermerkt, handelt es sich um p.A.-Reagenzien der Firma Merck, Darmstadt.

1.2. Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH)

Als Ausgangsmaterial für die sequenzanalytischen Untersuchungen diente kommerziell erhältliche Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.8.) aus Kaninchenmuskel (Boehringer, Mannheim). In diesem Präparat liegt das Enzymprotein als Kristallsuspension in Ammoniumsulfatlösung vor.

2. Modifizierungsreaktionen

Vor den Modifizierungsreaktionen wurde das Protein in 0,1 M Pyridinacetatpuffer pH 5,5 gelöst, auf einer 6 x 40 cm-Sephadex G 50-Säule in diesem Puffer vom Ammonsulfat abgetrennt und anschließend lyophilisiert.

2.1. ^{14}C -Carboxymethylierung (23)

Zur Carboxymethylierung wurden 240 mg GDH (6 μMol der Untereinheit) in Gegenwart von 6 M Guanidiniumhydrochlorid (Serva, p.A. oder Fluka, purissimum, p.A.) in 30 ml

0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8,2 gelöst und mit 20 μ Mol Dithioerythrit (Serva) 1 h lang bei 37 °C inkubiert (34). Anschließend wurden unter pH-Kontrolle und Lichtabschluß portionenweise insgesamt 200 μ Mol (2facher molarer Überschuß über alle SH-Gruppen) 14 C-markierte Jodessigsäure zugesetzt (gelöst in H₂O unter Zugabe einer äquivalenten Menge NaOH). Dazu wurden 250 μ Ci (4,4 μ Mol) 2- 14 C-Jodessigsäure (Amersham Buchler, Braunschweig) der spezifischen Aktivität 57 μ Ci/ μ Mol mit 650 μ Mol unmarkierter Jodessigsäure (Merck, zur Synthese, vor Gebrauch 2-mal umkristallisiert aus n-Hexan) verdünnt. Nach 2 h Reaktionszeit wurde die überschüssige Jodessigsäure mit 50 μ Mol Dithioerythrit abgesättigt und nach weiteren 30 min gegen 5 x 5 l 20 mM Natriumpyrophosphatpuffer pH 8,2 24 h lang dialysiert. Das dabei flockig ausfallende carboxymethylierte Protein wurde lyophilisiert.

2.2. Citraconylierung (21,22)

Bei der Acylierung des 14 C-carboxymethylierten Proteins mit Citraconsäureanhydrid wurde durch einen pH-Stat (Radiometer, Kopenhagen) ein konstanter pH-Wert von 8,5 aufrechterhalten. Die Umsetzung erfolgte durch portionenweise Zugabe von Citraconsäureanhydrid (Eastman) zu dem in 0,1 M Natriumpyrophosphatpuffer/6 M Guanidiniumhydrochlorid gelösten Protein unter automatischer Zufuhr von 4 N NaOH durch den pH-Stat. Insgesamt wurden zu 5 μ Mol carboxymethylierter GDH-Untereinheit 5,6 mmol Citraconsäureanhydrid zugegeben, das entspricht einem 40-fachen molaren Überschuß über alle Lysinreste des Proteins. Das citraconylierte Protein wurde durch Gelchromatographie auf einer 6 x 50 cm-Sephadex G 50-Säule in 0,1 M Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6 aus dem Reaktionsansatz isoliert und anschließend lyophilisiert.

2.3. Deblockierung der citraconylierten Peptide

Citraconylierte Peptide wurden zur Deblockierung in 0,1 bis 0,2 % Essigsäure (pH 3,0 bis 3,5) 15 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor einer Chromatographie in 30 % Ameisen- oder Essigsäure wurden die citraconylierten Peptide in diesen Lösungen deblockiert.

3. Spaltungen

3.1. Tryptische Spaltung

Zur tryptischen Spaltung wurde das modifizierte Protein in 0,1 M Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8,6 mit 1 Gew.-% TPCK-Trypsin (Worthington) 4 h lang bei 37 °C inkubiert. Die deblockierten Peptide wurden im gleichen Puffer durch Zusatz von TPCK-Trypsin im molaren Verhältnis 100 : 1 4 bis 15 h lang gespalten.

3.2. Bromcyanspaltung (15)

Vor der Bromcyanspaltung wurde das Peptid durch eine Gelchromatographie in 30 % Ameisen- oder Essigsäure von Ammoniak sowie evtl. vorhandenen primären oder sekundären Aminen befreit. Die Spaltung erfolgte in 70 % Ameisensäure mit einem 50-fachen molaren Überschuß von BrCN (Serva, reinst) über die Methioninreste 15 bis 24 h lang bei Raumtemperatur.

4. Isolierung der Peptide

4.1. Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Isolierung der Peptide erfolgte mit dem von Machleidt et al. (27,29) beschriebenen System durch Gelchromatographie an Sephadex-Gelen (superfein, Pharmacia, Frankfurt) und Bio-Gelen (-400 mesh, Bio-Rad, München), sowie durch Anionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex. Die speziellen Chromatographiebedingungen sind den Legenden der entsprechenden Abbildungen zu entnehmen.

Die zur Elution der Ionenaustauscher verwendeten linearen und konkaven Konzentrationsgradienten wurden durch Parallelschaltung von 2 Kolbenspritzenpumpen erzeugt (Abb. 33), von denen eine als magnetisch betätigte Mischkammer ausgebildet ist. (36).

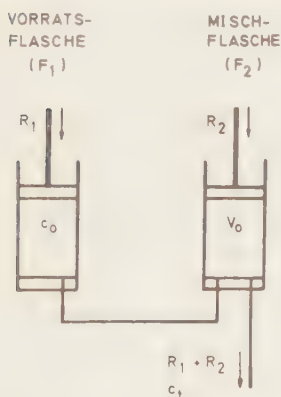
Die Detektion der von den Säulen eluierten Peptide erfolgt durch kontinuierliche UV-Photometrie in Durchflußküvetten bei 225 nm (Spektralphotometer Eigenbau), 253 nm und 280 nm (Photometer Eppendorf mit Quecksilberdampfampe und umschaltbarem Monochromator).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch kontinuierliche Radioaktivitätsmessungen mittels eines Durchfluß-Szintillationszählers (ICN Tracerlab Coruflo CMF-101) durchgeführt. Als Meßzelle diente dabei ein 0,1 x 20 cm Polyäthylenschlauch, der mit Plastiksintillator (NuklearEnterprises, Edinburgh) gefüllt ist. Damit wird für ^{14}C im Peakmaximum eine Zählausbeute von rund 10 % erzielt.

Die Säuleneluat wurden nach Zeit fraktioniert (20 oder 30 min) und in verschließbaren 1,5 ml Einmal-Plastik-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Zur Vereinigung der zu einem chromatographischen Peak gehörenden Fraktionen wurden diese über Nacht im Exsiccator getrocknet und ihr Inhalt mit geeigneten Lösungsmitteln in ein Gefäß überspült. Größere Volumina aus präparativen Läufen wurden lyophilisiert oder einrotiert.

Abb. 33:

Erzeugung von Gradienten für die Peptidchromatographie mit zwei Kolbenspritzenpumpen



R_1, R_2 : Flußraten der Kolbenspritzen F_1, F_2

V_0 : Anfangsvolumen in F_2

c_0 : Konzentration der Stammlösung in F_1

Die Konzentration c_t der aus F_1 zugemischten Substanz in F_2 zur Zeit t berechnet sich nach der Gleichung:

$$c_t = c_0 \left[1 - \left(\frac{a}{a+b \cdot t} \right)^{1/b} \right],$$

wobei $a = V_0/R_1$ u. $b = 1 - (R_1 + R_2)/R_1$ ist (35).

Daraus ergeben sich folgende Gradientenformen:

für $(R_1 + R_2) = 2R_1$ und $c_t = c_0 \cdot R_1 \cdot t / V_0$ ein linearer Gradient;

für $(R_1 + R_2) > 2R_1$ ein konkaver Gradient;

für $(R_1 + R_2) < 2R_1$ ein konvexer Gradient;

für $(R_1 + R_2) = R_1$ und $c_t = c_0 - c_0^{-t \cdot R_1 / V_0}$ ein konvex-exponentialer Gradient.
d.h. $R_2 = 0$

4.2. Dünnschicht-Chromatographie

Zur analytischen Dünnschicht-Chromatographie wurden Aliquote der säulenchromatographischen Fraktionen (0,2 bis 1 nMol) im Abstand von 1 cm nebeneinander auf Kieselgel-Fertigplatten (Merck Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm) aufgetragen. Die Platten wurden in einer verschlossenen Kammer in Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) 2 : 2 : 1 (v/v) aufsteigend entwickelt.

Zum Nachweis der Peptide wurden die Platten nach dem Trocknen mit einer 0,003 %-igen Lösung von Fluorescamin (Fluram p.A., Serva) in Aceton bepinselt und nach 5 bis 10 min im langwelligen UV-Licht betrachtet (37).

Zur präparativen Dünnschicht-Chromatographie wurden die Peptide als breite Striche aufgetragen. Die Banden wurden mit Fluorescamin ganz oder teilweise angefärbt und durch Auskratzen isoliert. Zur Elution der Peptide wurde das Schichtmaterial mehrere Male mit 25 % Methanol und 10 % Essigsäure extrahiert.

5. Analytische Methoden

5.1. Mengenbestimmungen von Protein und Peptiden durch UV-Spektrophotometrie

Die Registrierung von UV-Spektren im Wellenlängenbereich von 200 - 360 nm erfolgte mit einem Beckman DK-2 Spektralphotometer unter Verwendung einer Deuteriumlampe in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke.

5.2. Radioaktivitätsmessungen

Messungen der ^{14}C -Radioaktivität wurden an geeigneten Aliquoten der Proben (5-50 μl) in 5,0 ml Szintillationsflüssigkeit (6 g Permablend III, Packard, 600 ml Toluol und 400 ml Äthylenglykol-monomethyläther) mit einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer 2002 durchgeführt.

5.3. Aminosäureanalyse

Zur Aminosäureanalyse wurden Aliquote der Peptidfraktionen (1-3 nMol) in 0,2 ml 5,7 N HCl (3 x destilliert) in evakuierten und abgeschmolzenen Glasröhrchen 24-72 h lang bei 105 °C hydrolysiert. Nach Abziehen der HCl im Vakuum wurden die Proben in 10-100 μl Natriumcitratpuffer pH 2,2 aufgenommen und mit dem im Institut vorhandenen Aminosäureanalysator (36) quantitativ bestimmt.

5.4. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren von Peptiden mit der Dansyl-Technik (38)

0,5-1 nMol Peptid wurden in einem Glasröhrchen (0,3 x 5 cm) eingetrocknet, 1-2 mal in 10 μl 0,2 M NaHCO_3 aufgenommen und erneut eingetrocknet. Nach Zugabe von 20 μl frisch bereiteter Dansylchlorid-Lösung (p.A., Serva; eine Stammlösung von 2,5 mg/ml in Aceton wurde jeweils vor Gebrauch mit H_2O 1 : 1 verdünnt) wurden die Röhrchen (mit Parafilm verschlossen) 30 min bei 45 °C inkubiert. Nach dem Eintrocknen wurde der Rückstand in 20 μl 5,7 N HCl aufgenommen und im abgeschmolzenen Röhrchen 6 h bei 105 °C hydrolysiert.

Nach Abziehen der HCl im Vakuum wurde das trockene Hydro-

lysat in 5-10 μ l 95 % Äthanol aufgenommen. Zur Identifizierung der Dansyl-Aminosäuren wurde jeweils 0,1-1 μ l auf eine Seite der doppelseitig beschichteten Polyamidplatten (5 x 5 cm DC-Fertigfolien F 1 700 Mikropolyamid von Schleicher und Schüll) aufgetragen; auf der gegenüberliegenden Schicht wurde ein Testgemisch aller Dansyl-Aminosäuren (je 1 nMol/ μ l, Serva) chromatographiert. Zur Chromatographie wurden die (39) beschriebenen Fließmittel benützt. Nach dem Trocknen wurden die Platten im UV-Licht betrachtet. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit dem auf der gegenüberliegenden Seite chromatographierten Testgemisch, wenn nötig, zusätzlich durch Rechromatographie nach Auftragen geeigneter Referenzen.

6. Sequenzierung der Peptide

6.1. Automatische Sequenzierung am Festkörper

Die Peptide mit C-terminalem Homoserin wurden an porenkontrolliertes Aminopropylglas (40,17) angekoppelt (16,17) und mit einem im Institut gebauten Festphasen-Sequenator (41) automatisch sequenziert.

Zur Lactonisierung des C-terminalen Homoserins wurden die Peptide in wasserfreier Trifluoressigsäure (Fluka, destilliert über CrO_3 und aus H_2SO_4 redestilliert) 1 h lang bei 37 °C inkubiert und im Vakuum eingetrocknet. Der Rückstand wurde unmittelbar anschließend in 0,5 ml Dimethylformamid (über P_2O_5 destilliert) gelöst und mit 180 mg trockenem Aminopropyl versetzt. Nach Zugabe von 50 μ l Triäthylamin (destilliert über Ninhydrin) wurde die Glas-Suspension über Nacht bei Raumtemperatur be-

hutsam gerüttelt, danach auf einer Fritte mit Dimethylformamid, 50 % Pyridin und Methanol gewaschen und getrocknet.

Bei Peptiden mit ^{14}C -Carboxymethylcystein wurde durch Messung der Radioaktivität im Reaktionsansatz und anschließend in den Waschflüssigkeiten die Kopplungsausbeute bestimmt. Die Bestimmung der Kopplungsausbeuten von nichtradioaktiven Peptiden erfolgte durch Aminosäureanalyse nach Hydrolyse eines Aliquots des gewaschenen Glaträgers in 5,7 N HCl.

Die trockenen Glasperlen wurden in die Reaktionssäule des Festphasen-Sequencators eingefüllt und das Peptid mit dem in Abb. 34 gezeigten Programm automatisch abgebaut.

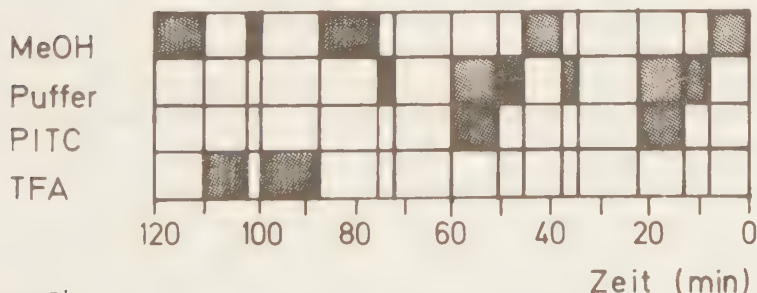


Abb. 34:

Im Festphasen-Sequencator verwendeter Abbau-Cyclus. Zeit von rechts nach links. MeOH: Methanol (Merck, p.A., getrocknet); Puffer: Sequenzierpuffer nach der Vorschrift von Laursen (8) aus Pyridin (über Ninhydrin destilliert), N-Methylmorpholin (Fluka, purum, über Ninhydrin destilliert) und Trifluoressigsäure; PITC: Phenylisothiocyanat (Fluka, purissimum, p.A.); TFA: Trifluoressigsäure (Fluka, purum, über CrO_3 destilliert und aus konz. H_2SO_4 destilliert).

Die im Sequenator gesammelten Fraktionen wurden einrotiert und in 0,2 ml 1 N HCl 10 min bei 80 °C inkubiert. Nach erneutem Einrotieren wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen und auf 1 x 2 cm-Säulen mit Dowex 50 x 4 aufgetragen (vorgewaschen mit 1 N HCl und Methanol), die mit einigen ml Methanol eluiert wurden (8). Das Eluat wurde einrotiert, in 1,5 ml-Plastik-Reaktionsgefäße übertragen und im Vakuum eingetrocknet. Zur Gaschromatographie wurden die Proben in 20-100 µl Essigsäureäthylester (Merck, Uvasol) gelöst, zur Abfüllung für die Massenspektrometrie nach erneutem Eintrocknen in Methanol.

Die Identifizierung der Phenylthiohydantoine (PTHs) erfolgte durch Gaschromatographie, Massenspektrometrie und durch Aminosäureanalyse nach Rückhydrolyse.

Zur Gaschromatographie wurden ein Beckman GC-45 (Flammenionisationsdetektor) oder ein Shimadzu GC-6 A (schwefelspezifischer flammenphotometrischer Detektor) benutzt. Die Trennung erfolgte in 0,2 x 90 cm-Glassäulen an PTH-Chrom-S (Serva), mit Helium als Trägergas und Wasserstoff/ Luft als Brenngase (42).

Zur Identifizierung von PTH-Ser, -Ala, -Gly, -Val, -Thr, -Pro, -Ile und -Leu diente ein isothermer Lauf bei 190 °C; PTH-Met, -Phe, -Tyr und der bei der Probenaufarbeitung entstehende PTH-Glu-Methylester wurden in einem isothermen Lauf bei 240 °C nachgewiesen.

Die massenspektrometrische Identifizierung der PTHs (43) erfolgte mit einem Quadrupol-Massenspektrometer Finnigan 3200. Die über den Festprobeneinlaß eingebrachten trockenen Proben wurden durch Aufheizen auf rund 200 °C inner-

halb einiger min verdampft und mit 20 eV ionisiert. Während des gesamten Verdampfungsvorgangs wurden die Massenspektren am Oszilloskop beobachtet; charakteristische Spektren im Massenbereich 160-330 wurden mit dem UV-Schreiber registriert.

Zur Rückhydrolyse (44) wurden entsprechende Aliquote der Sequenatorfraktionen in 0,2 ml 57 % HI unter N_2 in Glasröhrchen eingeschmolzen und 20 h bei 127 °C hydrolysiert. Nach dem Eintrocknen im Vakuum wurden die Proben in Natriumcitratpuffer aufgenommen, zentrifugiert und der Überstand zur Aminosäureanalyse aufgetragen.

6.2. Sequenzierung mit der Dansyl-Edman-Technik (45)

Der manuelle Edman-Abbau erfolgte an 5-20 nMol Peptid in verschließbaren Schliffgläschen mit spitz auslaufendem Boden. Vor jedem Abbauschritt wurde von dem in 0,1 ml H_2O gelösten Peptid ein Aliquot von 0,5-1 nMol entnommen, aus dem mit der Dansyl-Technik die endständige Aminosäure bestimmt wurde (vgl. D 5.4.). Dann wurden 0,1 ml 5 % Phenylisothiocyanat (Fluka, purissimum, p.A.) in Pyridin (destilliert über Ninhydrin) zugegeben, Stickstoff eingeleitet, und das verschlossene Röhrchen 1 h bei 45 °C inkubiert. Nach dem Eintrocknen im Ölvakuum (45 min bei 60 °C) wurde mit 0,2 ml wasserfreier Trifluoressigsäure (Fluka, purum, destilliert über CrO_3 , redestilliert aus H_2SO_4) bei 45 °C 30 min cyclisiert. Nach Abziehen der Trifluoressigsäure (Ölvakuum mit Gefrierfalle) wurden 0,2 ml H_2O zugegeben und mit 3 x 2 ml wassergesättigtem Butylacetat extrahiert. Die wäßrige Phase wurde eingetrocknet und zu Beginn des nächsten Abbaucyclus in 0,1 ml H_2O aufgenommen (s.o.).

E. Zusammenfassung

Die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH) aus Kaninchenmuskeln ist ein Enzymprotein aus zwei identischen Untereinheiten von je 350 Aminosäuren. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden rund drei Viertel der Primärstruktur in diesem Institut bestimmt. Die Aminosäuresequenzen stammen vorwiegend aus dem automatischen Abbau von größeren Fragmenten, die durch selektive Spaltung der 8 Methionylbindungen mit Bromcyan entstehen. Die Reihenfolge dieser Bromcyanpeptide in der Enzym-Untereinheit muß durch methioninhaltige Überlappungspeptide festgelegt werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Sequenzierung von zwei methioninhaltigen Peptiden, die durch tryptische Spaltung des Proteins nach reversibler Blockierung der Lysinreste mit Citraconsäureanhydrid erhalten wurden. Ausgehend von 1 μ Mol modifizierter GDH-Untereinheit wurden durch Gel- und Ionenaustausch-Chromatographie die beiden Peptide in Mengen von rund 300 nMol isoliert.

Das eine Peptid besteht aus 25 Aminosäuren. Nach Spaltung mit Bromcyan wurde der N-terminale Teil mit der Solid-Phase-Methode automatisch sequenziert; die restlichen 13 Positionen wurden durch manuelle Sequenzierung bestimmt. Das Peptid überlappt zwei bereits bekannte Bromcyanpeptide zu einer zusammenhängenden Sequenz von 86 Aminosäuren.

Das zweite Peptid ist 9 Aminosäuren lang und endet mit Methionin. Es wurde mit der Solid-Phase-Methode automatisch sequenziert. Bei diesem Peptid handelt es sich um kein Überlappungspeptid, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit um das C-terminale Peptid der GDH-Untereinheit. Dadurch wird ein bereits bekanntes Bromcyanpeptid von 26 Aminosäuren Länge als C-Terminus der Enzym-Untereinheit identifiziert.

F. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Rossmann, M.G., Liljas, A., Brändén, C.-I. & Banszak, L.-J.
(1975) in The Enzymes (Boyer, P.D., Hrsg.), Bd. 11,
61-102, Academic Press, New York.
2. Harris, J.I. & Perham, R.N.
(1968) Nature 219, 1025-1028.
3. Buehner, M., Ford, G.C., Moras, D., Olsen, K.W., Rossmann, M.G.
(1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 3052-3054.
4. Brändén, C.-I., Jörnvall, H., Eklund, H. & Furugren, B.
(1975) in (1), S. 103-190.
5. Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. & Nyc, J.F.
(1975) in (1), S. 293-367.
6. Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J. & Rossmann, M.G.
(1975) in (1), S. 191-292.
7. Banaszak, L.J. & Bradshaw, R.A.
(1975) in (1), S. 369-396.
8. Laursen, R.A.
(1971) Eur. J. Biochem. 20, 89-102.
9. Laursen, R.A.
(1975) in Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides (Weetall, H.H., Hrsg.) S. 576, Marcel Dekker, New York.
10. Edman, P. & Begg, G.
(1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-91.
11. Schiltz, E. & Reinbolt, J.
(1975) Eur. J. Biochem. 56, 467-481.
12. Wittmann-Liebold, B. & Lehmann, A.
(1975) in Solid-Phase Methods in Protein Sequence Analysis (Laursen, R.A., Hrsg.), S. 81-90, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.
13. Otto, J.
(1970) Dissertation, München

14. Otto, J., Raggi, A., Machleidt, W. & Bücher, Th.
(1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 332-344.
15. Gross, E.
(1967) Methods Enzymol. 11, 238-255.
16. Horn, M.J. & Laursen, R.A.
(1973) FEBS Lett. 36, 285-288.
17. Wachter, E., Hofner, H. & Machleidt, W.
(1975) in (12)', S. 31-46.
18. Assfalg, I.
(1976) Dissertation, München.
19. Harbers, B.
(1972) Dissertation, München.
20. Edman, P.
(1970) in Protein Sequence Determination (Needleman, S.B., Hrsg.), S. 211-255, Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
21. Atassi, M.Z. & Habeeb, A.F.S.A.
(1972) Methods Enzymol. 25, 546-553.
22. Butler, P.J.G. & Hartley, B.S.
(1972) Methods Enzymol. 25, 191-199.
23. Gurd, F.R.N.
(1972) Methods Enzymol. 25, 424-438.
24. Eisen, H.M., Belman, S. & Carsten, M.E.
(1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 4583.
25. Brosemer, R.W. & Kuhn, R.W.
(1969) Biochemistry 8, 2095.
26. Sugiyama, T., Suzuki, Y. & Takeuchi, T.
(1973) J. Chromatog. 77, 309-316.
27. Machleidt, W., Assfalg, I., Rückl, G. & Wachter, E.
(1975) in (12), S. 149-160.
28. Jörnvall, H.
(1970) Eur. J. Biochem. 16, 25-40.
29. Machleidt, W., Kerner, W. & Otto, J.
(1970) Z. Anal. Chem. 252, 151-158.
30. Kerner, W.
(1974) Dissertation, München.

31. Wang, S. & Carpenter, F.H.
(1965) J. Biol. Chem. 240, 1619.
32. Maroux, S., Röver, M. & Desnuelle, P.
(1966) Biochim. Biophys. Acta, 122, 147-150.
33. Mitchell, W.M. & Harrington, W.F.
(1968) J. Biol. Chem. 243, 4683-4692.
34. Cleland, W.W.
(1964) Biochemistry 3, 480-482.
35. Lakshmanan, T.K. & Lieberman, S.
(1953) Arch. Biochem. Biophys. 45, 235.
36. Krejci, K. & Machleidt, W.
(1969) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 981-993.
37. Felix, A.M. & Jimenez, M.H.
(1974) J. Chromatog. 89, 361-364.
38. Gray, W.R.
(1967) Methods Enzymol. 11, 139.
39. Gray, W.R.
(1972) Methods Enzymol. 25, 121-138.
40. Wachter, E., Machleidt, W., Hofner, H. & Otto, J.
(1973) FEBS Lett. 35, 97-102
41. Machleidt, W., Hofner, H. & Wachter, E.
(1975) in (12), S. 17-30.
42. Bober, H.
(1971) Beckman Report 1/71, 3-9.
43. Hagenmeier, H., Ebbighausen, W., Nicholson, G. & Vötsch, W.
(1970) Z. Naturforsch. 25, 681-689.
44. Smithies, O., Gibson, D., Fanning, E.M., Goodfliesh, R.M., Gilman, J.G. & Ballantyne, D.L.
(1971) Biochemistry 10, 4912-4921.
45. Gray, W.R.
(1972) Methods Enzymol. 25, 333-344.

G. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1. Aminosäuren

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asx	Asparaginsäure oder Asparagin
CM-Cys	Carboxymethyl-Cystein
Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glx	Glutaminsäure oder Glutamin
Gly	Glycin
His	Histidin
HSe	Homoserin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Try	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

2. Andere Abkürzungen

BrCN	Bromcyan
CM	Carboxymethyl-
Dansyl	Dimethylaminonaphthalinsulfonsäure

DMF	Dimethylformamid
GDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase EC. 1.1.1.8
MeOH	Methanol
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
PITC	Phenylisothiocyanat
QAE	Triäthyl-2-hydroxypropyl-ammonium-
TFA	Trifluoressigsäure
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanin-chlormethyl-ke-ton

Lebenslauf

Am 28.1.48 wurde ich in Geisenfeld/Ilm geboren. Meine Eltern sind der Realschuldirektor Wilhelm Homma und seine Frau Vilma, geb. Schmid. Ich habe noch eine jüngere Schwester.

Seit 1957 wohnen meine Eltern in Wasserburg am Inn. Dort legte ich 1967 die Reifeprüfung am Luitpold-Gymnasium ab. Anschließend studierte ich an der Universität München Medizin. Im Wintersemester 70/71 bestand ich das Physikum, im Wintersemester 73/74 das Staatsexamen.

Im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. Th. Bücher war ich von Juli 71 bis Oktober 73 als Doktorand, und nach dem Staatsexamen als Medizinalassistent tätig.

Im klinischen Teil meiner Medizinalassistentenzeit arbeitete ich am Städtischen Krankenhaus München-Harlaching und am Kreiskrankenhaus Ebersberg. Im Mai 75 erhielt ich die Bestallung als Arzt.

Gegenwärtig bin ich im Rahmen meiner Pflichtwehrzeit als Truppenarzt in Rottenburg/Laaber eingesetzt.

